



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07D 233/48, 239/14, C12N 15/87, A61K 31/47, C07J 41/00, C07K 5/06</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/51581</b> <b>(43) Date de publication internationale: 14 octobre 1999 (14.10.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/00740 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 30 mars 1999 (30.03.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/04121           2 avril 1998 (02.04.98)           FR 60/085,845       18 mai 1998 (18.05.98)       US <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BYK, Gerardo [IL/IL]; Saadia Gaon 3, 55513 Qyriat Ono (IL). FREDERIC, Marc [FR/FR]; 32, rue Denis Papin, F-91220 Brétigny sur Orge (FR). HOFLAND, Hans [NL/US]; 126 Albacore Lane, Foster City, CA 94404 (US). SCHERMANN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR). <b>(74) Mandataire:</b> NIEDERST, Claire; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AT, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
<b>(54) Title:</b> NOVEL NUCLEIC ACID TRANSFER AGENTS, COMPOSITIONS CONTAINING SAME AND USES <b>(54) Titre:</b> NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns novel compounds useful as agents for transferring nucleic acids into cells. Said novel compounds are more particularly related to the lipopolyamine family, and comprise at least a cyclic amidine function. They are useful for transfecting nucleic acids of interest into different cell types, <i>in vitro</i> as well as <i>in vivo</i> or <i>ex vivo</i>.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne de nouveaux composés utiles comme agents de transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Ces nouveaux composés sont plus particulièrement apparentés à la famille des lipopolyamines, et comportent au moins une fonction amidine cyclique. Ils sont utiles pour la transfection des acides nucléiques d'intérêt dans différents types cellulaires, aussi bien <i>in vitro</i> que <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLÉIQUES,  
COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne de nouveaux composés utiles comme agents de transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Ces nouveaux composés sont plus particulièrement apparentés à la famille des lipopolyamines, et comportent au moins une fonction amidine cyclique. Ils sont utiles pour la transfection des acides nucléiques dans différents types cellulaires, aussi bien *in vitro* que *ex vivo* ou *in vivo*.

Avec le développement des biotechnologies, la possibilité de transférer efficacement des acides nucléiques dans les cellules est devenue une nécessité. Il peut s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines recombinantes, ou au laboratoire, pour l'étude de la régulation de l'expression de gènes, le clonage de gènes, ou toute autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple pour la création d'animaux transgéniques, la réalisation de vaccins, des études de marquage ou également des approches thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *ex vivo*, dans des approches de greffes de moelle osseuse, d'immunothérapie ou d'autres méthodes impliquant le transfert de gènes dans des cellules prélevées d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure.

Différents types de vecteurs synthétiques ont été développés pour améliorer le transfert des acides nucléiques dans les cellules. Parmi ces vecteurs, les lipides cationiques possèdent des propriétés intéressantes. Ces vecteurs sont constitués d'une partie polaire, cationique, interagissant avec les acides nucléiques, et d'une partie lipidique, hydrophobe, favorisant la pénétration cellulaire. Des exemples particuliers de lipides cationiques sont notamment les lipides monocationiques (DOTMA : Lipofectin®), certains détergents cationiques (DDAB), les lipopolyamines et en particulier la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPEs), dont la préparation a été décrite par exemple dans la demande de brevet EP 394 111. Une autre famille de

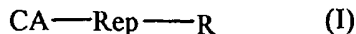
lipopolyamines est représentée par les composés tels que décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence, et sont illustrés à la figure 1.

5 Mais jusqu'à présent, les injections dans les tissus, et notamment les muscles, étaient souvent faites avec de l'ADN non-formulé afin de faciliter son entrée dans les cellules, l'association à des vecteurs synthétiques conduisant à des complexes de taille trop importante pour être incorporés dans les cellules.

10 C'est un des principaux problèmes que la présente invention se propose de résoudre. En effet, les composés selon l'invention possèdent l'avantage inattendu de présenter un niveau de transfection *in vivo* dans le muscle au moins équivalent à celui obtenu avec l'ADN non-formulé et en tout état de cause un très bon niveau de transfection dans les autres tissus. L'association avec un composé selon l'invention protège l'ADN des dégradations par les nucléases et/ou des détériorations au cours de la lyophilisation, ce qui contribue à améliorer significativement la stabilité des 15 formulations nucléolipidiques. De plus, une telle association permet une libération contrôlée lente des acides nucléiques.

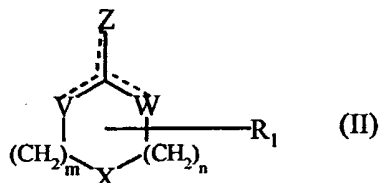
20 Par ailleurs, les composés selon la présente invention appartiennent à la famille des lipides cationiques et portent une région cationique originale qui confère aux dits composés des propriétés améliorées, notamment une cytotoxicité réduite par rapport aux vecteurs cationiques de l'art antérieur. Cette partie cationique est en effet plus précisément représentée par une ou plusieurs polyamine particulière(s), portant une ou plusieurs fonctions amidine cycliques qui ont très probablement pour effet de « délocaliser » les charges positives, rendant le composé globalement moins cationique, avec les effets bénéfiques qui en découlent sur le plan de la toxicité.

25 Ainsi, un premier objet de l'invention concerne de nouveaux composés sous forme D, L, ou DL, de formule générale (I) :



pour laquelle :

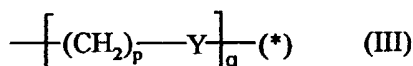
① CA représente un groupement cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



pour laquelle :


- 5 • m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels que m+n est supérieur ou égal à 1,

- R<sub>1</sub> représente un groupement de formule générale (III) :



- pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, Y représente un groupement carbonyle, amino, méthylamino, ou bien méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements  $[(\text{CH}_2)_p-\text{Y}]$ , et (\*) représente soit un atome d'hydrogène, soit est le lieu de liaison au groupement Rep,
- 10 étant entendu que R<sub>1</sub> peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II), y
- 15 compris Z, et qu'il y a un unique groupe R<sub>1</sub> dans la formule (II),

- X représente un groupement NR<sub>2</sub> ou bien CHR<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> étant soit un atome d'hydrogène soit la liaison au groupe R<sub>1</sub> tel que défini précédemment,

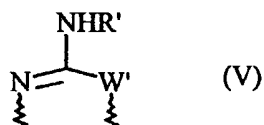
- Le groupement  représente :

- \* 1<sup>er</sup> cas : un groupement de formule générale (IV) :



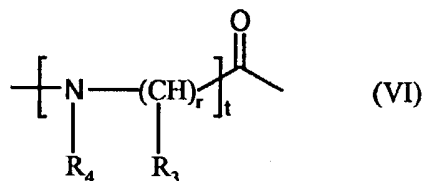
pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au groupe R<sub>1</sub> tel que défini précédemment, ou bien

- 5 \* 2<sup>ème</sup> cas : un groupement de formule générale (V) :



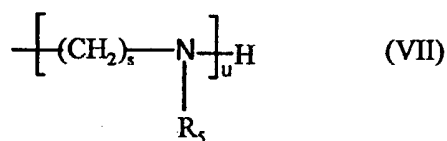
pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au groupe R<sub>1</sub> tel que défini précédemment,

- 10 ② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



dont l'atome d'azote est rattaché aux atomes X, V, W, ou Z ou au substituant Y du groupe R<sub>1</sub> selon les cas, et

- t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,
- 15
- r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements -NR<sub>4</sub>-(CH)<sub>r</sub>-,
  - R<sub>3</sub>, qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements NR<sub>4</sub>-(CH)<sub>r</sub>R<sub>3</sub>, représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :



pour laquelle u est un entier compris entre 1 et 10 inclus, s est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements  $-(\text{CH}_2)_s-\text{NR}_5$ , et  $\text{R}_5$  est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que

5 définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

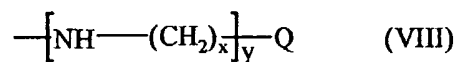
- $\text{R}_4$  est défini de la même façon que  $\text{R}_3$  ou bien représente un groupement CA tel que
- 10 défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

ⓐ R est lié à la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent R est lié directement au groupement CA, et représente :

- \* soit un groupement de formule  $\text{NR}_6\text{R}_7$  pour laquelle  $\text{R}_6$  et  $\text{R}_7$  représentent
- 15 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de carbone, avec l'un au moins des deux substituants  $\text{R}_6$  ou  $\text{R}_7$  différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

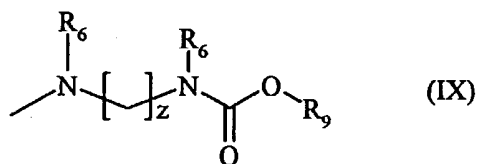
\* soit un dérivé de stéroïde,

- 20 \* soit un groupement de formule générale (VIII) :



pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement  $\text{C}(\text{O})\text{NR}_6\text{R}_7$  pour lequel  $\text{R}_6$  et  $\text{R}_7$  sont

définis comme précédemment, soit Q représente un groupement  $C(O)R_8$  pour lequel  $R_8$  représente un groupement de formule (IX) :



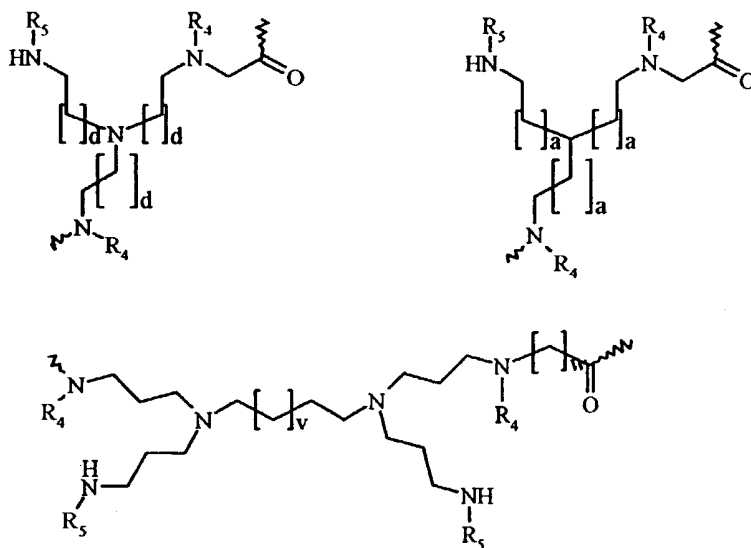
pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et  $R_9$  est un radical aliphatique saturé ou non, éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde, et les deux substituants  $R_6$  sont, indépendamment l'un de l'autre, définis comme précédemment,

ou bien  $R_8$  représente un groupement  $-O-R_9$  pour lequel  $R_9$  est défini comme ci-dessus.

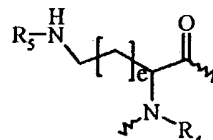
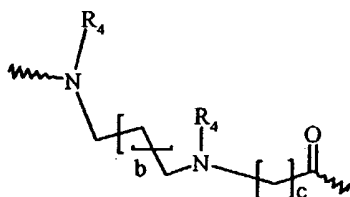
Selon une variante de l'invention, le groupement  $R_1$  est lié soit à Z soit à V d'une part et au groupement Rep d'autre part par l'intermédiaire de Y.

Avantageusement, le groupement cycloamidine CA de formule (II) comporte 5, 6, 7 ou 8 chaînons.

Par ailleurs, dans une autre variante de l'invention, Rep est un répartiteur à 1, 2, ou 3 « bras ». On peut par exemple citer les répartiteurs suivants :







Selon une seconde variante de l'invention,  $R_3$  représente un atome d'hydrogène ou un méthyle et  $R_4$  est tel que défini précédemment, ou bien  $R_3$  et  $R_4$  présent dans la formule (VI) représentent des atomes d'hydrogène, ou bien  $R_4$  est un atome d'hydrogène et  $R_3$  est un groupement de formule (VII) dans laquelle  $R_5$  représente un groupement CA

Préférentiellement, dans la formule (V),  $p$  et  $q$  sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3 ou 4.

De manière générale, le groupement  $R$  contient au moins un segment hydrophobe. On entend au sens de l'invention par « segment hydrophobe » tout groupement de type lipidique, favorisant la pénétration cellulaire. En particulier, le groupement  $R$  contient au moins une chaîne aliphatique ou au moins un dérivé de stéroïde.

Selon une variante préférée, le groupement  $R$  représente un groupement de formule  $NR_6R_7$ ,  $R_6$  et  $R_7$  étant définis comme précédemment, ou bien représente un groupement de formule générale (VIII) dans laquelle  $Q$  représente un groupement  $C(O)NR_6R_7$ ,  $R_6$  et  $R_7$  étant définis comme précédemment.

Préférentiellement,  $R_6$  et/ou  $R_7$  représentent indépendamment l'un de l'autre une chaîne aliphatique linéaire saturée ou insaturée contenant 10 à 22 atomes de carbone, de préférence en 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone. Il s'agit par exemple des groupements  $(CH_2)_{11}CH_3$ ,  $(CH_2)_{13}CH_3$ ,  $(CH_2)_{15}CH_3$ ,  $(CH_2)_{17}CH_3$ , oléyl etc...

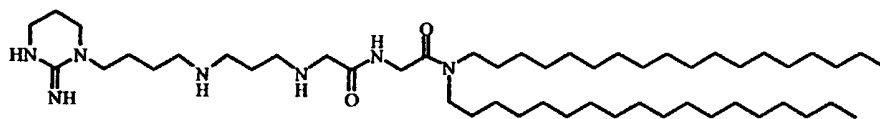
Dans un mode particulier de mise en oeuvre, les groupes  $R_6$  et  $R_7$  sont identiques ou différents et représentent chacun une chaîne aliphatique saturée ou non,

linéaire ou ramifiée, éventuellement fluorée, contenant 10 à 22 atomes de carbone, telle que définie au paragraphe précédent.

Lorsque R représente un dérivé de stéroïde, celui-ci est avantageusement choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- $\alpha$ -5-cyclo-5- $\alpha$ -cholestan-6- $\beta$ -ol, l'acide cholique, le cholestérylforniate, le cholestanylforniate, le 3 $\alpha$ ,5-cyclo-5 $\alpha$ -cholestan-6 $\beta$ -yl formiate, la cholestérylamine, la 6-(1,5-diméthylhexyl)-3a,5a-diméthyl-hexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.

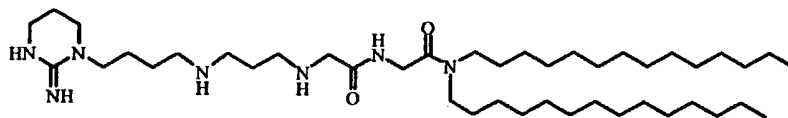
Ces nouveaux composés de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou encore avec les bases organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

A titre d'exemple illustrant des composés préférés selon l'invention, on peut citer les composés de formules suivantes :

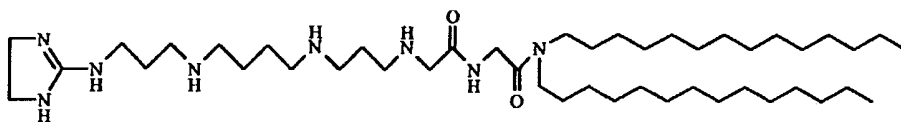


**Composé (1)**

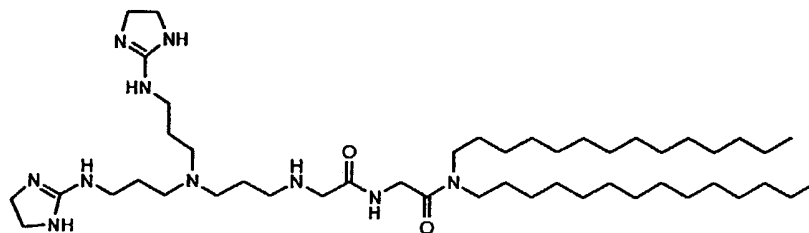
N-diocadécylcarbamoylemethyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide

**composé (2)**

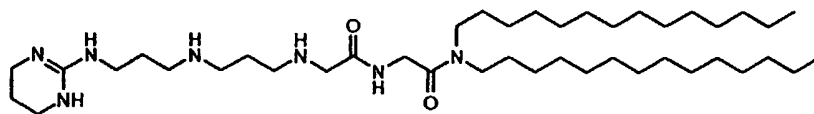
N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide

**Composé (3)**

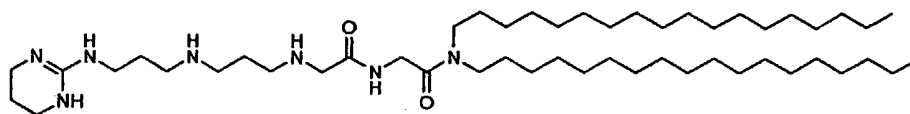
2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide

**Composé (4)**

2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide.

**Composé (5)**

N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acétamide

**Composé (6)**

N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acétamide

Les composés de l'invention peuvent être préparés de différentes façons. Selon une première méthode, les composés de l'invention peuvent être obtenus par synthèse des lipopolyamines analogues (c'est-à-dire la même structure mais sans groupement cycloamidine), la cyclisation en groupements cycloamidine étant effectuée dans un second temps. Les lipopolyamines analogues peuvent être obtenues par toute méthode connue de l'homme du métier, et notamment selon les méthodes décrites dans la demande WO 97/18185 ou par des méthodes analogues. La cyclisation des têtes amidine peut par exemple être effectuée par réaction entre une et/ou plusieurs amines primaires de la lipopolyamine et des réactifs tels que l'hydrogénosulfate d'O-méthylisourée sulfate [J. Med. Chem., 1995, 38(16), pp. 3053-3061] ou le semisulfate de S-méthylisothiourée [Int. J. Pept. Prot. Res., 1992, 40, pp. 119-126]. De préférence, on opère en milieu aqueux en présence d'une base à chaud [J. Med. Chem., 1985, pp. 694-698 et J. Med. Chem., 1996, pp. 669-672]. A titre de solvant préféré, on peut citer les mélanges eau/alcool ou le diméthylformamide. A titre de base, on peut utiliser la triéthylamine, la N-éthyl-diisopropylamine, la soude, la potasse etc... La température est comprise de préférence entre 40°C et 60°C, et encore plus préférentiellement, la réaction est mise en oeuvre à 50°C.

Une autre méthode consiste à effectuer une synthèse de briques portant la fonction cycloamidine qui sont ensuite greffée(s) sur des lipides équipés de répartiteurs. Cette méthode présente l'avantage d'accéder à un nombre important de produits. Au sens de l'invention, on entend par « briques » tout segment fonctionnel de la molécule. Par exemple, le groupement cycloamidine CA tel que défini dans la formule générale (II), Rep ou encore R constituent des briques distinctes les une des autres au sens de l'invention.

A titre d'exemple, on peut par exemple procéder de la façon suivante :

**1) Synthèse de la brique R :**

a) Lorsque R représente  $-NR_6R_7$ , soit il est disponible commercialement, soit il peut être synthétisé selon l'une des méthodes suivantes :

5 • par réduction alkylative entre une amine portant le groupe  $R_6$  et un aldéhyde portant le groupe  $R_7$ . On opère de préférence dans un solvant chloré (par exemple le dichloromethane, le chloroforme, le dichloro-1,2-éthane etc... [J. Org. Chem., 1996, pp. 3849-3862]) ou dans tout autre solvant organique compatible avec la réaction (par exemple du tétrahydrofuranne), en présence de triacétoxyborohydrure de sodium, 10 cyanoborohydrure de sodium ou ses dérivés (par exemple le cyanoborohydrure de lithium) [J. Am. Chem. Soc., 1971, pp. 2897-2904] et d'acide acétique.

• ou bien par substitution d'un groupe partant porté par  $R_6$ , par une amine portant le groupe  $R_7$ . A titre d'exemple de groupe partant, on peut citer les atomes d'halogène (Br, Cl, I) ou les substituants tosyl, mésyl, etc... On opère de préférence en présence 15 d'un réactif basique, par exemple du carbonate de sodium, de la potasse, de la soude de la triéthylamine etc..., dans un alcool (par exemple l'éthanol) au reflux [J. Am. Chem. Soc., 1996, pp. 8524-8530]

• ou bien par couplage entre un acide gras (ou ses dérivés comme les chlorures d'acide gras par exemple ) et une amine grasse. L'amide obtenu est alors réduit par un hydrure, 20 par exemple l'hydrure de lithium aluminium ou tout autre hydrure connu de l'homme du métier, dans un éther (par exemple le tétrahydrofuranne (THF), le *t*-butylméthyléther (TBME), le diméthoxyéthane (DME), etc...).

b) Lorsque R représente un groupement de formule générale (VIII), on effectue le couplage peptidique entre le groupement Q et  $H-[NH-(CH_2)_x]_yCOOH$ . Le couplage 25 peptidique est effectué selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier (Bodanski M., *Principles and Practices of peptide Synthesis*, Ed. Springe-Verlag) ou par toute méthode analogue connue. Notamment, la réaction peut s'effectuer en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables (comme le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile,

le dichlorométhane etc...), à température comprise entre 0 et 100 °C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

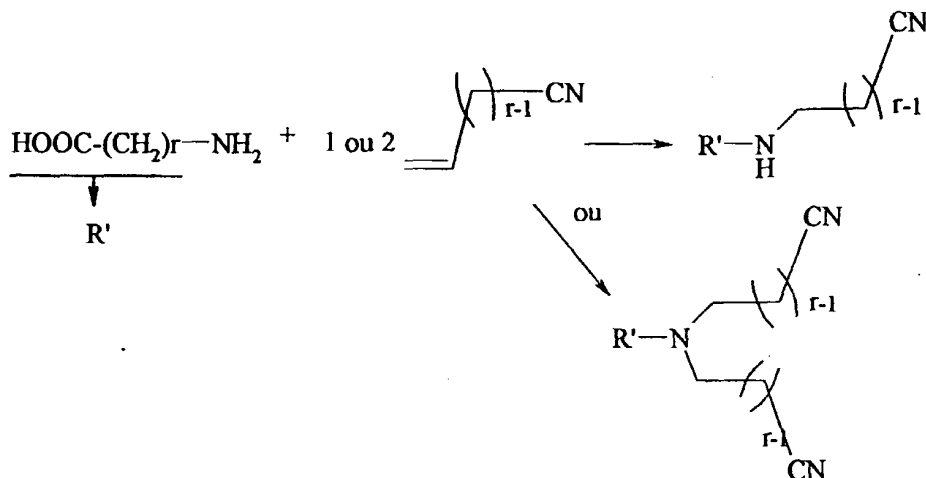
Q est soit disponible commercialement, soit lorsque Q représente un groupement C(O)R8 avec R8 de formule (IX), il peut être synthétisé par réaction entre un chloroformiate commercial (par exemple le cholestérychloroformiate) ou obtenu selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier à partir d'un chloroformiate commercial, et une diamine commerciale (par exemple la N-éthylènediamine) ou obtenue selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier. De préférence, on opère dans un solvant chloré (par exemple le dichlorométhane, le chloroforme, le dichloro-1,2-éthane etc...) ou dans tout autre solvant organique compatible avec la réaction comme par exemple le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde, l'acétonitrile etc...

Le groupement H-[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>]<sub>y</sub>-COOH est un acide aminé commercial lorsque y est égal à 1, ou bien est obtenu par une ou plusieurs réactions de cyanoéthylation selon les méthodes décrites ci-après dans la synthèse de Rep lorsque y est supérieur à 1.

## 2) Synthèse de la brique Rep :

Le groupement Rep est obtenu par cyanoéthylation ou par dicyanoéthylation (selon que l'on souhaite obtenir une structure de Rep linéaire ou branchée) d'un acide aminé de formule HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH<sub>2</sub> puis par réduction des fonctions nitriles en amines.

a) mono- ou di-cyanoéthylation :



- De préférence, on opère en milieu aqueux basique. Par exemple, la réaction est effectuée dans des solvants comme l'eau, les alcools (par exemple le méthanol, l'éthanol etc...) en présence d'une base telle que la soude, la potasse, la triéthylamine etc... Dans le cas de la monocynoéthylation, on travaille de préférence à froid [J. Am. Chem. Soc., 1950, pp. 2599-2603]. Dans le cas de la dicyanoéthylation, on travaille de préférence à chaud et avec un excès d'acrylonitrile [J. Am. Chem. Soc., 1951, pp. 1641-1644]
- 5 b) La réduction des fonctions nitriles en amines est effectuée par hydrogénation catalytique en milieu basique ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut utiliser de l'oxyde de platine ou encore du nickel de Raney [J. Org. Chem., 1988, pp. 3108-3111] comme catalyseur. De préférence, le solvant choisi est un alcool (par exemple le méthanol, l'éthanol etc...) en présence d'une base, par exemple de la soude, de la potasse etc...
- 10

### 3) Synthèse de la brique Rep-R :

- 15 La brique Rep-R est obtenu par couplage peptidique entre l'acide Rep et l'amine R obtenus aux étapes précédentes.

Le couplage peptidique est effectué selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier (Bodanski M., *Principles and Practices of peptide Synthesis*, Ed. Springer-Verlag) ou par toute méthode analogue connue. Notamment, la réaction peut s'effectuer en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables (comme le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile, le dichlorométhane etc...), à température comprise entre 0 et 100 °C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

20

### 4) Synthèse des composés selon l'invention CA-Rep-R :

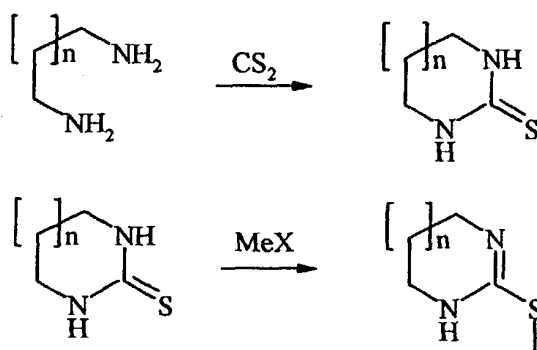
- 25 Les composés selon l'invention sont obtenus selon plusieurs méthodes possibles :

a) par couplage en milieu basique entre l'amine terminale présente sur Rep-R obtenu à l'étape précédente, et CA-S-CH<sub>3</sub>, selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier. On opère de préférence dans un solvant chloré (par exemple le dichlorométhane, le chloroforme etc...) ou dans d'autres solvants organiques compatibles avec la réaction comme par exemple l'eau, les alcools, le

30

diméthylformamide etc..., en présence d'une base (par exemple la triéthylamine, la soude, la potasse, la N-éthyl-diisopropylamine etc...). et à température ambiante (20°C environ).

- La brique CA-S-CH<sub>3</sub> est soit disponible commercialement (c'est le cas par exemple de l'hydroiodure de 2-méthylthio-2-imidazoline), soit elle peut être obtenue par action d'un disulfure de carbone sur une diamine appropriée (c'est-à-dire choisie en fonction du groupement cycloamidine qu'on souhaite obtenir), suivie d'une méthylation. Par exemple, le schéma réactionnel peut être illustré de la façon suivante :



- De préférence, le processus réactionnel est mis en oeuvre dans un alcool (par exemple l'éthanol). L'étape de méthylation est effectuée par action d'un halogénométhyle, l'atome d'halogène pouvant être par exemple un atome d'iode [J. Am. Chem. Soc., 1956, pp. 1618-1620 et Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, pp. 351-354].

- b) par cyclisation interne du groupement cycloamidine à partir des fonctions amino présentes sur Rep-R, par action d'hydrogénosulfate d'O-méthylisourée ou de semisulfate de S-méthylisothiourée. De préférence, on opère en milieu aqueux en présence d'une base à chaud [J. Med. Chem., 1985, pp. 694-698 et J. Med. Chem., 1996, pp. 669-672]. A titre de solvant préféré, on peut citer les mélanges eau/alcool ou le diméthylformamide. A titre de base, on peut utiliser la triéthylamine, la N-éthyl-diisopropylamine, la soude, la potasse etc... La température est comprise de préférence entre 40°C et 60°C, et encore plus préférentiellement, la réaction est mise en oeuvre à 50°C.



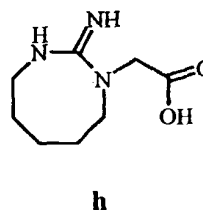
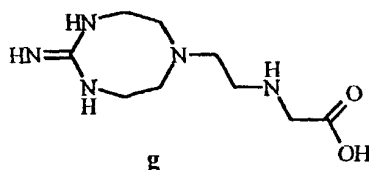
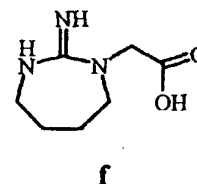
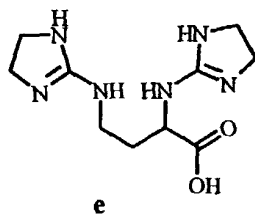
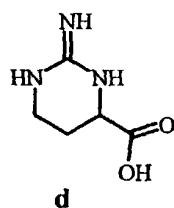
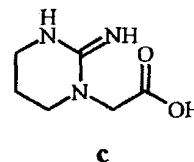
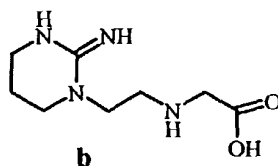
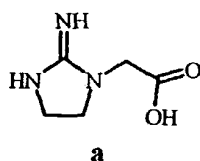
c) par couplage peptidique entre CA-COOH et Rep-R selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier, comme décrit précédemment.

La brique CA-COOH peut être obtenue de différentes manières :

• par action d'une brique CA-S-CH<sub>3</sub> sur un acide aminé ou un acide polyaminé  
5 selon les méthodes connues de l'homme du métier ou par tout autre méthode analogue [J. Am. Chem. Soc., 1956, pp. 1618-1620]. La brique CA-S-CH<sub>3</sub> est obtenue de la même façon que précédemment, et l'acide aminé ou polyaminé est choisi en fonction du composé selon l'invention souhaité, ou bien

• par action d'un S,S-diméthyl-tosyl-iminothiocarbonimide ou de l'un de ses  
10 dérivés sur un acide polyaminé selon les méthodes connues de l'homme du métier ou par tout autre méthode analogue [J. Org. Chem., 1971, pp. 46-48]. De préférence on opère en milieu éthanolique en présence d'une base (par exemple la soude) et à la température de reflux du mélange.

A titre d'exemple de briques CA-COOH pouvant être obtenues par l'une des  
15 méthodes décrites ci-dessus, on peut citer les briques suivantes :



Dans toutes les réactions exposées précédemment, lorsque les substituants amino présents dans les différents groupements peuvent interférer avec les réactions mises en oeuvre, il est préférable de les protéger préalablement par des radicaux compatibles pouvant être mis en place et éliminés sans toucher au reste de la molécule.

- 5 A titre d'exemple, les radicaux protecteurs peuvent être choisis parmi les radicaux décrits par T.W. GREENE, *Protective Groups in Organic Synthesis*, J. Wiley-Interscience Publication (1991) ou par McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press (1973).

- Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant au moins  
10 un composé de formule (I) tel que défini précédemment. En particulier un autre objet selon la présente invention comprend un composé de formule (I) tel que défini ci-avant et un acide nucléique. Lorsque un composé selon l'invention et un acide nucléique sont mis en présence, ils forment un complexes par interaction entre les charges positives présentes à pH physiologique sur le composé selon l'invention et les charges  
15 négatives de l'acide nucléique. Ce complexe est appelé « complexe nucléolipidique » dans toute la suite. Préférentiellement, le composé selon l'invention et l'acide nucléique sont présents en quantités telles que le rapport des charges positives du composé sur les charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 0,1 et 50, de préférence entre 0,1 et 20. Ce rapport peut être ajusté aisément par l'homme du métier en  
20 fonction du composé utilisé, de l'acide nucléique, et des applications recherchées (notamment du type de cellules à transfecter).

- On entend au sens de l'invention par « acide nucléique » aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire  
25 (ADNc), d'ARN messenger (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc... Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par  
30 synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification

chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonuléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, des cassettes d'expression, etc... Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter une origine de réplication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc...

De préférence, l'acide nucléique comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

On entend au sens de l'invention par « cassette d'expression d'un gène d'intérêt » un fragment d'ADN qui peut être inséré dans un vecteur à des sites de restriction spécifiques. Le fragment d'ADN comprend une séquence d'acide nucléique codant pour un ARN ou un polypeptide d'intérêt et comprend en outre les séquences nécessaires à l'expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de polyadénylation etc...) de ladite séquence. La cassette et les sites de restriction sont conçus pour assurer une insertion de la cassette d'expression dans un cadre de lecture approprié pour la transcription et la traduction.

Il s'agit généralement d'un plasmide ou d'un épisome portant un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. A titre d'exemple on peut citer les plasmides décrits dans les demandes de brevet WO 96/26270 et WO 97/10343 incorporées à la présente par référence.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit

protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc... (FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc...) les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc..., FR 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc..., FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme, catabolisme etc...

L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique

décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou  
5 plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides  
10 antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", d'autres virus ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le  
15 peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes  
20 eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc... En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de  
25 régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène d'intérêt thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut

également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les compositions selon l'invention peuvent en outre comporter un ou plusieurs  
5 adjuvants capables de s'associer aux complexes formés entre le composé selon l'invention et l'acide nucléique, et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un acide nucléique, un composé de formule (I) tel que défini ci-avant et un  
10 ou plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes nucléolipidiques composé (I)/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La présence de ce type d'adjuvants (lipides, peptides ou protéines par exemple) peut permettre avantageusement d'augmenter le pouvoir transfectant des composés.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre  
15 comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport de charges R est faible. La Demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente  
20 invention sont des lipides à deux chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -  
25 mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

5 Plus récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un produit intervenant ou non directement au niveau de la condensation de l'acide nucléique (WO 96/25508). La présence d'un tel produit, au sein d'une composition selon l'invention, permet de diminuer la quantité de composé de formule (I), avec les conséquences bénéfiques qui  
10 en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante. Par produit intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un produit compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce produit peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un produit annexe qui lui est  
15 directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique. Par exemple, le produit précompactant peut être n'importe quel polycation, par exemple la polylysine. Selon un mode de réalisation préféré, ce produit intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline  
20 et/ou de l'un de leurs dérivés. Un tel produit peut également être constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple par un ou plusieurs  
25 acides aminés, ou de nature chimique.

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant(s) pour un équivalent d'acides nucléiques en mol/mol et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions de la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'ADN vers certains, types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau etc...). L'élément de ciblage peut être lié au composé selon l'invention ou également à l'acide nucléique comme cela a été précisé précédemment.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit de sucres de peptides ou de protéines tels que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou des fragments de récepteurs, etc... En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialydés tel que le sialyde Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv).

L'association des éléments de ciblage aux complexes nucléolipidiques de l'invention peut être effectuée par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par couplage à une partie hydrophobe ou à une partie qui interagit avec l'acide nucléique du composé de formule générale (I) selon l'invention, ou encore à un groupement qui interagit avec le composé de formule générale (I) selon l'invention ou avec l'acide nucléique. Les interactions en question peuvent être, selon un mode préféré, de nature ionique ou covalente.



Selon une autre variante, les compositions de l'invention peuvent aussi incorporer au moins un agent de surface non-ionique en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques composé de formule générale (I)/acide nucléique. L'introduction d'agents de surface non-ionique prévient la formation d'agrégats, ce qui rend la composition plus particulièrement adaptée à une administration *in vivo*. Les compositions selon l'invention incorporant de tels agents de surface présentent un avantage sur le plan de l'innocuité. Elles présentent également un avantage supplémentaire en ce sens qu'elles diminuent le risque d'interférences avec d'autres protéines compte tenu de la réduction de la charge globale des compositions de complexes nucléolipidiques.

Les agents de surface sont constitués avantageusement d'au moins un segment hydrophobe, et d'au moins un segment hydrophile. Préférentiellement, Le segment hydrophobe est choisi parmi les chaînes aliphatiques, les polyoxyalkylène, les polyester d'alkylidène, les polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique et le cholestérol, et le segment hydrophile est avantageusement choisi parmi les polyoxyalkylène, les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones ou les saccharides. De tels agents de surface non-ioniques ont été décrits dans la demande WO 98/34648.

L'invention a également pour objet l'utilisation des composés de formule générale (I) tels que définis ci-avant pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies par transfert d'acides nucléiques (et plus généralement de polyanions) dans les cellules primaires ou dans les lignées établies. Il peut s'agir en particulier de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses (neurones, astrocytes, cellules gliales), hépatiques, de la lignée hématopoïétique (lymphocytes, CD34, dendritiques etc...), épithéliales, etc..., sous forme différenciées ou pluripotentes (précurseurs).

Une telle utilisation est particulièrement avantageuse car les composé de formule générale (I) selon l'invention présentent une cytotoxicité réduite par rapport aux lipides cationiques de l'art antérieur. La Demanderesse a notamment mis en évidence qu'à des rapports de charges très élevés entraînant habituellement la mort des animaux consécutivement à la transfection, aucune cytotoxicité apparente n'était

décelée. Les composés selon l'invention peuvent être utilisés notamment pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* d'acides nucléiques. Pour des utilisations *in vivo*, par exemple en thérapie ou pour l'étude de la régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le coeur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, les tissus conjonctifs, etc... Avantagusement, les tissus transfectés sont les muscles et les poumons.

L'invention concerne en outre une méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé de formule générale (I) tel que défini ci-avant, pour former un complexe nucléolipidique, et

(2) la mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique formé en (1).

La mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*). L'incubation est réalisée de préférence en présence de par exemple de 0,01 à 1000 µg d'acide nucléique pour 10<sup>6</sup> cellules. Pour une administration *in vivo*, des doses d'acide nucléique comprises entre 0,01 et 10 mg peuvent par exemple être utilisées.

Dans le cas où les compositions de l'invention contiennent en outre un ou plusieurs adjuvants tels que définis précédemment, le ou les adjuvants sont préalablement mélangés au composé de formule générale (I) selon l'invention ou bien à l'acide nucléique.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement des maladies par administration d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger ladite maladie, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I) tel que défini précédemment, dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique, l'acide nucléique administré codant pour ledit produit protéique ou étant transcrit en un produit nucléique ou encore constituant ledit produit nucléique.

L'invention s'étend à toute utilisation d'un composé de formule (I) selon l'invention pour la transfection *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro* de cellules.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée. Notamment, la Demanderesse propose à titre non-limitatif divers protocoles opératoires ainsi que des intermédiaires réactionnels susceptibles d'être mis en oeuvre

pour préparer les composés de formule générale (I). Bien entendu, il est à la portée de l'homme du métier de s'inspirer de ces protocoles et/ou produits intermédiaires pour mettre au point des procédures analogues en vue de conduire à d'autres composés de formule générale (I) selon l'invention.

## 5 **FIGURES**

Figure 1 : Structure des vecteurs synthétiques dénommé lipide A, lipide B, lipide c et lipide D dans la présente invention et décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence.

Figure 2 : Représentation schématique du plasmide pXL2774.

- 10 Figures 3 : Diagramme de phase des complexes nucléolipidiques composé (1)/ADN. La liaison du composé (1) à l'ADN a été déterminée en suivant la diminution de la fluorescence (en %, 100% étant la fluorescence de l'ADN nu) du bromure d'éthidium (EtBr) (symbole ●, ligne pleine), comme décrit selon l'axe y situé à droite. La taille des particules de complexes (en nm) est indiquée sur l'axe y situé à gauche. L'axe x
- 15 représente le rapport de charge agents de transfert/ADN. La taille des complexes nucléolipidiques sans co-lipide est représenté par le symbole ■ en ligne pleine. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 25% de cholestérol est représenté par le symbole □ en ligne discontinue. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 40% de DOPE est représenté par le symbole ◆ en ligne discontinue. La
- 20 méthode ne permet pas de déterminer la taille des particules au delà de 3 µm.

- Figure 4 : Activité de transfert de gène *in vitro* dans des cellules HeLa des complexes nucléolipidiques contenant le composé (1) selon la présente invention sans co-lipide (barre du milieu en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre de gauche en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre de droite en gris clair),
- 25 comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes nucléolipidiques dans lesquels l'ADN est complètement saturé en composé selon l'invention et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 5 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (3), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (3) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 6 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (5), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (5) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 7 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (6), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (6) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 8 : Activité de transfert de gène *in vivo* après injection directe dans le muscle des complexes contenant le composé (1) selon la présente invention ou le composé de formule  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (appelé « lipide A » dans toute la suite) sans co-lipide (barre en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre en gris clair), comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 9 : L'importance de l'invention est illustrée en comparant l'activité de transfert de gène de deux lipides différents, le composé (1) selon l'invention et le lipide A, et de l'ADN nu via deux routes d'administration : par voie intraveineuse (iv) et par voie

intramusculaire (im). Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

**Figure 10 :** Activité de transfert de gène *in vivo* 48 heures après injection i.m. des complexes nucléolipidiques contenant les composés (5) ou (6) selon la présente invention sans co-lipide et à rapport de charge 0,25/1, comparativement à l'ADN nu. L'expression est exprimée en pg de luciférase par ml. En partant de la gauche, les barres représentent : (a) contrôle négatif ; (b) ADN nu ; (c) Composé (5) et (d) composé (6).

## 10 MATERIEL ET METHODES

### A\ MATERIEL

- Les acides aminés, polyaminés (ou leur dérivés) de départ sont disponibles commercialement. C'est le cas par exemple de la N-(3-aminopropyl)glycine, N-(2-cyanoethyl)glycine, ou encore de l'acide 2,4-diaminobutyric, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques connues de l'homme du métier.
- Les isothiourées cycliques sont également des produits commerciaux, comme par exemple l'hydroiodure de 2-méthylthio-2-imidazoline, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques connues de l'homme du métier.
- Les amines substituées par un/des lipide(s) sont commerciales ou bien synthétisées à partir des amines et aldéhydes correspondants par réduction alkylative.
- Les produits tels que la triéthylamine, l'acide trifluoroacétique, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium (BOP), la diméthylaminopyridine (DMAP), le chloroformate de benzyle, le dicarbonate de di-*tert*-butyle sont des produits commerciaux. Les solutions de chlorure de sodium et de carbonate de sodium sont saturées. La solution de sulfate de potassium est concentrée à 0,5 M.

## B\ METHODES

### 1) Mesures Physiques.

Les spectres de RMN Proton ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 400 et 600 MHZ.

- 5 Les spectres de masse ont été réalisés sur un API-MS/III.

### 2) Méthodes de purification et d'analyse

#### a) Conditions de chromatographie en phase directe

- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

- 10 Elles sont révélées soit aux U.V. (254 nm), à la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg/100 cm<sup>3</sup> d'éthanol) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C, à la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg/100 cm<sup>3</sup> d'acétone) pour révéler les amines primaires, au vert de bromocrésol, en vaporisant une solution (0,1 % dans le propanol-2) pour révéler les
- 15 acides, à la vanilline en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de vanilline (3 %) avec 3 % d'acide sulfurique suivi d'un chauffage à 120°C, ou à l'iode en recouvrant la plaque de poudre d'iode.

- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

- 20 b) Conditions de purification CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) préparative

L'appareillage est un ensemble pour la chromatographie en phase liquide en mode gradient permettant une détection U.V. Cette chaîne préparative est composée des éléments suivants :

- 25 Pompe A : GILSON modèle 305 équipée d'une tête 50 SC.

Pompe B : GILSON modèle 303 équipée d'une tête 50 SC.

Boucle d'injection : 5 ml.

Module de pression : GILSON modèle 806.

Mélangeur : GILSON modèle 811 C équipé d'une tête de 23 ml.

Détecteur UV : GILSON modèle 119 équipé d'une cellule préparative.

Collecteur de fraction : GILSON modèle 202 équipé de portoirs n° 21 et de tube en verre de 10 ml.

5 Intégrateur : SHIMADZU modèle C-R6A.

Colonne : Colonne C4 (10 mm) en acier inoxydable de 25 cm de longueur et de 2.2 cm de diamètre commercialisée par VYDAC modèle 214 TP 1022.

La solution de produit à purifier est chargée sur la colonne par l'intermédiaire de la boucle d'injection, l'éluat est recueilli par fractions de un tube en 30 secondes. Le

10 détecteur est réglé aux longueurs d'onde de 220 nm et 254 nm.

les phases mobiles sont ainsi définie :

<u>Solvant A</u>		<u>Solvant B</u>	
Eau déminéralisée	2500 cm <sup>3</sup>	Acétonitrile pour HPLC	2500 cm <sup>3</sup>
Acide trifluoroacétique	2 cm <sup>3</sup>	Acide trifluoroacétique	2,5 cm <sup>3</sup>

Gradient :

Temps en minutes	% de solvant A	% de solvant B	Débit en cm <sup>3</sup> /min
0	90	10	18
10	90	10	18
110	0	100	18
120	0	100	18

### c) Techniques de chromatographie Analytique

- Les analyses CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) ont été réalisées  
 15 sur un appareil Merck-Hitachi équipé d'un intégrateur calculateur D 2500 HITACHI,  
 d'un autosampler AS-2000A, d'une pompe intelligent L-6200A, et d'un détecteur UV-  
 vis L-4000 avec longueur d'onde réglable mise à 220 nm.

Les colonnes pour les séparations analytiques sont des colonnes Browlee en acier  
 inoxydable de 3 cm de longueur et de 0,46 cm de diamètre commercialisées par

20 APPLIED BIOSYSTEM.



La phase stationnaire est constituée par de l'Aquapore Butyl 7 micron. Les phases mobiles sont l'eau (avec de l'acide trifluoroacétique) et l'acétonitrile (avec de l'acide trifluoroacétique). Les injections sont de 20 µl d'une solution d'environ 1 mg/cm<sup>3</sup> dans une vanne à boucle de 0,1 cm<sup>3</sup>. Le débit pour les analyses est réglé entre 1 cm<sup>3</sup>/min et 4 cm<sup>3</sup>/min. La pression est de 180 bars environ.

Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous :

<u>Solvant A</u>		<u>Solvant B</u>	
Eau déminéralisée	2500 cm <sup>3</sup>	Acétonitrile pour HPLC	2500 cm <sup>3</sup>
Acide trifluoroacétique	2 cm <sup>3</sup>	Acide trifluoroacétique	2.5 cm <sup>3</sup>

10 Gradient :

Temps en minutes	% de solvant A	% de solvant B	Débit en cm <sup>3</sup> /minute
0	60	40	1
3	60	40	1
20	0	100	1
35	0	100	1
35.1	60	40	4
36.1	60	40	4
36.2	60	40	2
44	60	40	2

## EXEMPLES

### A) SYNTHÈSES DES COMPOSÉS SELON L'INVENTION

**Exemple 1 : synthèse du composé (1)** (N-dioctadécylcarbamoyleméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du lipide cationique de formule condensée  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  appelé « lipide B » dans la suite (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 1).

Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique, on dissout 0,784 mmol de lipide B dans 25 cm<sup>3</sup> de méthanol, et on ajoute 10,21 mmol de triéthylamine. Puis on coule lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Methylisourée et d'acide sulfurique (1,173 mmol) dans de l'eau (9 cm<sup>3</sup>). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant vingt heures.

Ensuite, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 cm<sup>3</sup>), d'éthanol (4 cm<sup>3</sup>), et d'acide trifluoroacétique (1 cm<sup>3</sup>). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient ainsi 194 mg (0,163 mmol) de produit salifié.

Rendement : 20,8 %

CLHP analytique : Rt = 15,99 minutes.

Spectre de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO d<sub>6</sub>, δ en ppm) : 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 6H : CH<sub>3</sub> des chaînes grasses) ; 1,24 (mt, 60H : CH<sub>2</sub> centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,70 (mt, 4H : 1 CH<sub>2</sub> de chaque chaîne grasse) ; 1,57 (mt, 4H : (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centraux du butyle) ; 1,88 et 1,96 (2 mts, 2H chacun : CH<sub>2</sub> central du propyle et CH<sub>2</sub> central du cycle) ; de 2,85 à 3,35 (2 mts, 16H en totalité : les 8 NCH<sub>2</sub>) ; 3,81 (s large, 2H : NCH<sub>2</sub>CON) ; 4,03 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycyle) ; 7,25 et 7,84 (respectivement s et s large, 1H chacun : les 2 NH du cycle) ; 8,61 (t, J = 5,5 Hz, 1H : NHCO) ; 8,70 et 9,02 (2 mfs, 1H chacun : les 2 NH).

MH<sup>+</sup> = 846

Exemple 2 : synthèse du composé (2) (N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du composé de formule condensée NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> appelé « lipide C » dans la suite (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 1).

Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique on dissout 1,036 mmol de lipide C dans 30 cm<sup>3</sup> de méthanol, et on ajoute 13,13 mmol de triéthylamine. Puis on coule

lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Methylisourée et d'acide sulfurique (1,554 mmol) dans de l'eau (9 cm<sup>3</sup>). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant une vingtaine d'heures. Puis, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (3 cm<sup>3</sup>), d'éthanol  
 5 (2 cm<sup>3</sup>), et d'acide trifluoroacétique (0,5 cm<sup>3</sup>). Cette solution est injectée en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 218 mg (0,2022 mmol) de produit salifié.

10 Rendement : R = 19,5 %

CLHP analytique : Rt = 10.76 minutes.

Spectre de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO d<sub>6</sub>, δ en ppm) : 0,88 (t, J = 7 Hz, 6H : CH<sub>3</sub> des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et de 1,50 à 1.65 (2 mts, 2H chacun : 1 CH<sub>2</sub> de chaque chaîne grasse) ;  
 15 1,59 (mt, 4H : les 2 CH<sub>2</sub> centraux du butyle) ; 1,91 et 1,97 (2 mts, 2H chacun : CH<sub>2</sub> central des propyles) ; de 2,85 à 3,10 (mt, 10H : les 2 NCH<sub>2</sub> du butyle - les 2 NCH<sub>2</sub> d'un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH<sub>2</sub> de l'autre propyle) ; 3,23 et de 3,30 à 3,50 (2 mts, respectivement 5H et 1H : l'autre NCH<sub>2</sub> de l'autre propyle et NCH<sub>2</sub> des chaînes grasses) ; 3,79 (mf, 2H : NCH<sub>2</sub>CON) ; 4,03 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycycle) ; 7,27 et de 8,40 à 9,30 (respectivement s large et mf, 2H et 4H : NH<sub>2</sub><sup>+</sup> CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, NH<sup>+</sup> CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> et =NH) ; 7,88 et 8,61 (respectivement s et s large, 1H chacun : respectivement NHC=N et CONH).

MH<sup>+</sup> = 734

Exemple 3 : synthèse du composé (3) (2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-  
 25 acétamide) à partir du lipide C (voir exemple 2 et figure 1 pour sa structure).

Dans un ballon équipé d'un compte-bulle et d'un barreau magnétique, on dissout 0,36 mmol de iodure de 2-méthylmercapto-2-imidazolinium dans 0,36 cm<sup>3</sup> de soude 1N. A cette solution on ajoute 0,36 mmol de lipide C préalablement dissout dans  
 30 1,44 cm<sup>3</sup> de soude 1N, 5 cm<sup>3</sup> d'eau, et 4 cm<sup>3</sup> d'éthanol. Le mélange est maintenu sous

agitation jusqu'à l'arrêt de dégagement de méthyl mercaptan (24 heures). Le mélange est ensuite concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 cm<sup>3</sup>), d'éthanol (4 cm<sup>3</sup>), et de d'acide trifluoroacétique (0,5 cm<sup>3</sup>). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.

- 5 Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 213 mg ( 0,1727 mmol ) de produit salifié.

Rendement : R = 48 %

HPLC<sub>analytique</sub> : Rt = 8,90 minutes.

- 10 Spectre de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO d<sub>6</sub> avec ajout de quelques gouttes de CD<sub>3</sub>COOD d<sub>4</sub>, δ en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH<sub>3</sub> des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et 1,55 (2 mts, 2H chacun : 1 CH<sub>2</sub> de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : les 2 CH<sub>2</sub> centraux du butyle) ; de 1,80 à 1,95 (mt, 4H : CH<sub>2</sub> central des propyles) ; de 2,80 à 3,05 (mt, 10H :  
15 les 2 NCH<sub>2</sub> du butyle - les 2 NCH<sub>2</sub> d' un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH<sub>2</sub> de l'autre propyle) ; 3,24 (mt, 6H : l'autre NCH<sub>2</sub> de l'autre propyle et NCH<sub>2</sub> des chaînes grasses) ; 3,56 (s, 2H : NCH<sub>2</sub>CON) ; 3,62 (s, 4H : NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ; 4,02 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycyle).

MH<sup>+</sup> = 777

- 20 Exemple 4 : Synthèse du composé (4) (2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

#### I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTRADÉCYLAMINE (a)

- Le groupement Gly dont les amines sont protégées par des groupements Boc  
25 (10 mmol) et la ditétradécylamine (10 mmol) sont introduit dans un ballon de 250 ml, et on ajoute 100 cm<sup>3</sup> de dichlorométhane. Le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. 30 mmol de N-éthyl-diisopropylamine (DIEA) et 11 mmol de phosphonium de benzotriazol-1-yloxytrisdiméthylamine (BOP) sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA, et le mélange est agité pendant 2 heures. Lorsque la  
30 réaction est achevée, (suivie par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et

le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle (300 cm<sup>3</sup>). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide.

- 5 Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM: R<sub>f</sub> = 0,9 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup>: 567

II) SYNTHÈSE DE [Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (b)

1) Synthèse de NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (c)

- 10 L'amine de la N-(cyanoéthyl)-glycine (0,1 mol/amine, commerciale) est solubilisée dans de la soude 1N (200 cm<sup>3</sup>/amine) et du dioxane (200 cm<sup>3</sup>). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de O-(*t*-butoxycarbonyl)<sub>2</sub> ou de *p*-chlorobenzoyloxycarbonyl (ClZ, 0,14 mol/amine) dans 200 cm<sup>3</sup> de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur
- 15 supérieure à 9. Puis le mélange est agité à environ 20°C pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm<sup>3</sup>) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et
- 20 évaporée sous vide. Le produit (c) de formule NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH est obtenu avec un rendement de 98%.

CCM: R<sub>f</sub> = 0,66 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 8:2)

MH<sup>+</sup>: 229

2) Synthèse de NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (d)

- 25 Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit 50 mmol de produit (c) de formule NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH. On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm<sup>3</sup> d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit 2 cm<sup>3</sup> de Nickel de raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de
- 30 52 bar environ, et elle descend à environ 48,5 bar en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé à l'éthanol

(4 fois 25 cm<sup>3</sup>), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient le produit (d) qui est utilisé sans autre purification dans la suite.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,12 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

MH<sup>+</sup> : 233

5      **3) Synthèse de [NC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (e)**

Dans un ballon, le produit (d) de formule NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (0,05 mol) et de la soude (0,1 mol) sont solubilisés dans 150 cm<sup>3</sup> d'eau. La solution est refroidie dans un bain de glace. Sous vive agitation, on coule lentement de l'acrylonitrile (0,12 mol) en gardant la température de la masse inférieure à 20°C. Le mélange de réaction est maintenu une nuit à température ambiante (20°C). Puis le mélange est maintenu à 50°C pendant 2 heures. Le solvant est évaporé sous vide, puis le mélange est acidifié à pH 3 avec une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 200 cm<sup>3</sup>), puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis filtrée et évaporée sous vide. Le « brut » est éventuellement purifié sur une colonne de silice. On obtient le produit (e) avec un rendement de 50%.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,75 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

MH<sup>+</sup> : 339

20      **4) Synthèse de [Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (b)**

Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit le produit (e) de formule [NC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (50 mmol). On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm<sup>3</sup> d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit cette solution dans l'autoclave. Un courant d'azote est passé dans l'autoclave et on introduit 2 cm<sup>3</sup> de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 bar environ, et elle descend à 48,5 bar environ en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (4 fois 25 cm<sup>3</sup>), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

CCM:  $R_f = 0,14$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 6:4)

Le solide obtenu précédemment est solubilisé dans de la soude 1N (200  $\text{cm}^3$ /amine) et du dioxane (200  $\text{cm}^3$ ). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de (*t*-butoxycarbonyl)<sub>2</sub>O ou de p-chlorobenzoyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200  $\text{cm}^3$  de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100  $\text{cm}^3$ ) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100  $\text{cm}^3$ ). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP.

Le Produit brut est purifié sur une colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2).

On obtient le produit (b) avec un rendement de 66% par rapport au produit (d).

CCM:  $R_f = 0,42$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 6:4)

MH<sup>+</sup>: 615

### III) SYNTHÈSE DE $[\text{Z-NH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{-CH}_3]_2$ (f)

Le produit (a) dont les amines sont protégées par des groupements Boc (1 mmol) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30  $\text{cm}^3$  d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide puis le produit est séché par coévaporation avec 3 fois 30  $\text{cm}^3$  d'éther éthylique.

CLHP:  $R_t = 12,86$  min, ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Le produit obtenu (Gly-ditétradécylamine, 10 mmol) et le produit (b) (10 mmol) sont introduit dans un ballon de 250  $\text{cm}^3$ , du dichlorométhane (100  $\text{cm}^3$ ) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. 30 mmol de N-éthyl-diisopropylamine

(DIEA) et 11 mmol d'hexafluorophosphate de BOP sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA et le mélange est agité pendant deux heures. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et le solide obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm<sup>3</sup>). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont utilisés sans autres purifications. Le produit (f) est obtenu avec un rendement de 75 % après purification sur une colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2).

CCM : R<sub>f</sub> = 0,86 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 8:2)

CLHP : R<sub>t</sub> = 17,44 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

#### IV) SYNTHÈSE DE [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (g)

Le produit (f) dont les amines sont protégées, est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de méthanol par gramme de produit. Du palladium sur charbon (10 %, 1g/g de produit) et du formiate d'ammonium (1 g/g de produit) sont ajoutés à température ambiante. L'hydrogénolyse est suivie par CLHP. Après deux heures, la réaction est achevée, le mélange est filtré, et le filtre lavé avec 3 fois 10 cm<sup>3</sup> de méthanol par gramme de produit. De l'eau bi-distillée est ajoutée et la solution est congelée et lyophilisée, ou bien le filtrat est concentré à sec et le solide est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm<sup>3</sup>). La phase organique est lavée par une solution de carbonate de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>), et une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>), puis elle est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CLHP et sont utilisés sans autres purifications. Le produit (g) est obtenu avec un rendement de 40 % par rapport au produit (f).

CLHP : R<sub>t</sub> = 9,62 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).



MH<sup>+</sup> : 795.

#### V) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (4)

le produit (g) qui contient l'amine primaire à modifier (1 mmol/amine) est solubilisé dans du dichlorométhane (10 cm<sup>3</sup>), puis on ajoute de l'hydroiodure de 2-méthylthio  
 5 imidazoline (1,2 mmol/amine) et de la triéthylamine (1,3 mmol/amine). Le mélange est agité à température ambiante (20 °C) jusqu'à l'arrêt du dégagement de sulfure de méthyle. A la fin de la réaction (suivie par CLHP), le dichlorométhane est évaporé sous vide.

Le produit obtenu, dont les amines sont protégées par des groupements Boc, (1 mmol)  
 10 est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 cm<sup>3</sup> d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide puis le produit est séché par coévaporation avec 3 fois 30 cm<sup>3</sup> d'éther éthylique.

15 Le produit obtenu est purifié par CLHP préparative et les fractions analysées par CLHP. On obtient ainsi le composé (4) selon la présente invention avec un rendement de 34 %.

CLHP : R<sub>t</sub> = 10,07 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

20 Spectre de R M N <sup>1</sup>H (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO d<sub>6</sub> à une température de 383K, d en ppm) : 0,92 (t, J = 7 Hz, 6H : CH<sub>3</sub> des chaînes grasses) ; de 1,25 à 1,45 (mt, 44H : (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> centraux des chaînes grasses) ; 1,57 (mt, 4H : 1 CH<sub>2</sub> de chaque chaîne grasse) ; de 1,70 à 1,90 (mt, 6H : CH<sub>2</sub> central des propyles) ; de 2,50 à 3,40 (mt, 16H : les 2 NCH<sub>2</sub> des propyles et les NCH<sub>2</sub> des chaînes grasses) ; 3,68 (s, 8H : les 2 NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)  
 25 ; 3,72 (s large, 2H : NCH<sub>2</sub>CON) ; 4,06 (s, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycyle).

MH<sup>+</sup> : 831

Exemple 5 : Synthèse du composé (5) : (N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

## I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTRADECYLAMINE

(a)

On opère de la même façon que dans l'exemple précédent. Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM :  $R_f = 0,9$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9:1)

5  $\text{MH}^+$  : 567

II) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH

(b)

1) Synthèse de NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH

(c)

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 4. Le produit (c) est obtenu avec un rendement de 98 %.

10 CCM :  $R_f = 0,66$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 8:2)

$\text{MH}^+$  : 229

2) Synthèse de NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH

(d)

Le produit (d) est obtenu de la même façon que précédemment dans l'exemple 4.

CCM :  $R_f = 0,12$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 6:4)

15  $\text{MH}^+$  : 233

3) Synthèse de NC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH

(e)

Dans un ballon, le produit (d) (0,05 mol) et de la soude (0,1 mol) sont solubilisés dans 150 cm<sup>3</sup> d'eau. La solution est refroidie dans un bain de glace. Sous vive agitation, on coule lentement de l'acrylonitrile (0,05 mol) en gardant la température de la masse inférieure à 20°C. Le mélange de réaction est maintenu une nuit à température ambiante (20°C).

20

Le solvant est évaporé sous vide, puis le mélange est acidifié à pH 3 avec une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 200 cm<sup>3</sup>), puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est éventuellement purifié sur une colonne de silice.

25

Le produit obtenu (0,1 mol/amine) est solubilisé dans de la soude 1N (200 cm<sup>3</sup>/amine) et du dioxane (200 cm<sup>3</sup>). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de (Boc)<sub>2</sub>O ou de p-

30

chlorobenzoyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200 cm<sup>3</sup> de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm<sup>3</sup>) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP.

Le produit (e) est ainsi obtenu avec un rendement est de 93 %.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,75 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 8:2)

MH<sup>+</sup> : 386

#### 4) Synthèse de Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (b)

Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit le produit (e) (50 mmol). On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm<sup>3</sup> d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mmol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit cette solution dans l'autoclave. Un courant d'azote est passé dans l'autoclave et on introduit 2 cm<sup>3</sup> de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 bar environ, et elle descend à 48,5 bar environ en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (4 fois 25 cm<sup>3</sup>), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,14 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

Le produit obtenu (0,1 mol/amine) est solubilisé dans de la soude 1N (200 cm<sup>3</sup>/amine) et du dioxane (200 cm<sup>3</sup>). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution p-chlorobenzoyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200 cm<sup>3</sup> de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec

- de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm<sup>3</sup>) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié sur une colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 9:1). Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP. Le produit (b) est obtenu avec un rendement de 32 % par rapport au produit (d).

CCM: R<sub>f</sub> = 0,63 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup>: 523

### III) SYNTHÈSE DU 2-méthylsulfanyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (f)

- Dans un ballon sous agitation et courant d'azote, le 3,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinethiol (0,0103 mol) est chargé, et 5 cm<sup>3</sup> de méthanol et 0,65 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle (0,0105 mol) sont ajoutés. Le mélange est porté au reflux durant 1 heure puis est laissé à refroidir à température ambiante (20°C). Le produit est précipité par ajout de 5 cm<sup>3</sup> d'éther éthylique. Le précipité est filtré puis lavé à l'éther éthylique. Le produit est ensuite séché une nuit sous une pression de 34 mbar.
- On obtient 1,5 g (0,0041 mol) de produit (VI), soit un rendement de 40 %.

CCM: R<sub>f</sub> = 0,25 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup>: 131

### d) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>

(g)

- Le produit (a) dont les amines sont protégées par des groupements Boc (1 mmol) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 cm<sup>3</sup> d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide puis le produit obtenu est séché par coévaporation avec 3 fois 30 cm<sup>3</sup> d'éther éthylique.

CLHP: R<sub>t</sub> = 12,86 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- Le produit obtenu (10 mmol) et le produit (b) (10 mmol) sont introduit dans un ballon de 250 cm<sup>3</sup>. Du dichlorométhane (100 cm<sup>3</sup>) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à

dissolution complète. 30 mmol de DIEA et 11 mmol de BOP sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA et le mélange est agité pendant deux heures. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et le solide obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm<sup>3</sup>). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont utilisés sans autres purifications.

Après purification sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2), on obtient le produit (g) avec un rendement de 85%.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,9 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

CLHP : R<sub>t</sub> = 19,79 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

V) SYNTHÈSE DE NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (h)

Le produit (g) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de méthanol/g de produit. Du palladium sur charbon (10 %, 1g/g de produit) et du formiate d'ammonium (1 g/g de produit) sont ajoutés à température ambiante (20°C). L'hydrogénolyse est suivie par CLHP. Après deux heures, la réaction est achevée, le mélange est filtré, et le filtre lavé avec 3 fois 10 cm<sup>3</sup> de méthanol/g de produit. De l'eau bi-distillée est ajoutée, et la solution est congelée et lyophilisée, ou bien le filtrat est concentré à sec et le solide est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm<sup>3</sup>). La phase organique est lavée par une solution de carbonate de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>), et une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm<sup>3</sup>), puis elle est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CLHP et sont utilisés sans autres purifications. Le produit (h) est obtenu avec un rendement de 93 % par rapport au produit (g).

CCM : R<sub>f</sub> = 0,42 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

CLHP : R<sub>t</sub> = 14,66 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH<sup>+</sup> : 838

#### VI) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (5)

Le produit (h) contenant l'amine primaire à modifier (1 mmol/amine) est solubilisé dans du dichlorométhane (10 cm<sup>3</sup>), puis on ajoute le produit (f) (1,2 mmol/amine) et la triéthylamine (1,3 mmol/amine). Le mélange est agité à température ambiante (20°C) jusqu'à l'arrêt du dégagement de sulfure de méthyle. A la fin de la réaction (suivie par CLHP), le dichlorométhane est évaporé sous vide.

Le produit obtenu est purifié par CLHP préparative et les fractions analysées par CLHP. Le composé (5) est ainsi obtenu avec un rendement de 38 %.

10 CLHP : R<sub>t</sub> = 8,42 min, (H<sub>2</sub>O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Spectre de R M N <sup>1</sup>H (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO d<sub>6</sub>, δ en ppm) : 0,86 (t, J = 7 Hz, 6H : CH<sub>3</sub> des chaînes grasses) ; de 1,10 à 1,35 (mt, 44H : (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> centraux des chaînes grasses) ; 1,44 et 1,53 (2 mts, 2H chacun : 1 CH<sub>2</sub> de chaque chaîne grasse) ; de 1,80 à 2,00 (mt, 6H : CH<sub>2</sub> central des propyles et CH<sub>2</sub> de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 2,80 à 3,10 (mt, 10H : NCH<sub>2</sub> des propyles et NCH<sub>2</sub> de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 3,15 à 3,45 (mt : les 6H correspondant au =NCH<sub>2</sub> de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine et aux NCH<sub>2</sub> des chaînes grasses) ; 3,81 (mf, 2H : NCH<sub>2</sub>CON) ; 4,04 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycyle) ; 7,89 - 8,62 - 8,75 et 9,01 (4 mfs, 8H en totalité : les échangeables et OH des CF<sub>3</sub>COOH).

MH<sup>+</sup> : 720

**Exemple 6 : Synthèse du composé (6) :** (N-dioctadécylcarbamoyleméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

#### 25 I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTADÉCYLAMINE (a)

On opère de la même façon que dans l'exemple précédent. Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,9 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup> : 567

#### 30 II) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH (b)

**1) Synthèse de NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH****(c)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. Le produit (c) est obtenu avec un rendement de 98 %.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,66 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 8:2)

5 MH<sup>+</sup> : 229

**2) Synthèse de NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH****(d)**

Le produit (d) est obtenu de la même façon que précédemment dans l'exemple 5.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,12 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

MH<sup>+</sup> : 233

**3) Synthèse de NC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH****(e)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. Le produit (e) est ainsi obtenu avec un rendement est de 93 %.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,75 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 8:2)

MH<sup>+</sup> : 386

**4) Synthèse de Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COOH****(b)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,14 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 6:4)

20 Le produit obtenu est utilisé de la même façon que précédemment afin de protéger l'amine terminale par un groupement benzyloxycarbonyle. Le produit (b) est ainsi obtenu avec un rendement de 32 % par rapport au produit (d).

CCM : R<sub>f</sub> = 0,63 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup> : 523

**III) SYNTHÈSE DU 2-méthylsulfanyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine****(f)**

25 On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient ainsi 1,5 g (0,0041 mol) de produit (f), soit un rendement de 40 %.

CCM : R<sub>f</sub> = 0,25 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

MH<sup>+</sup> : 131

**IV) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N-Boc-CH<sub>2</sub>-COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>**

30 (g)

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient ainsi le produit (a) dont les groupements Boc ont été clivés.

CLHP :  $R_t = 19,44$  min, ( $H_2O/MeCN$  : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 5 Ce produit obtenu est utilisé de la même façon avec le produit (b) que précédemment dans l'exemple 5. Après purification sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2), on obtient le produit (g) avec un rendement de 84 %.

CCM :  $R_f = 0,9$  ( $CHCl_3/MeOH$ , 9:1)

- 10 CLHP :  $R_t = 23,95$  min., ( $H_2O/MeCN$  : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

V) SYNTHÈSE DE  $NH_2(CH_2)_3]_2-N-Boc-(CH_2)_3-NH-Boc-CH_2-COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$  (h)

On opère de la même façon que précédemment avec l'exemple 5. Le produit (h) est obtenu avec un rendements de 73 % par rapport au produit (g).

- 15 CCM :  $R_f = 0,28$  ( $CHCl_3/MeOH$ , 6:4)

CLHP :  $R_t = 20,59$  min, ( $H_2O/MeCN$  : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH<sup>+</sup> : 838

VI) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (6)

- 20 On opère de la même façon que précédemment à l'exemple 5. Le composé (6) est ainsi obtenu avec un rendement de 68 %.

CLHP :  $R_t = 15,83$  min, ( $H_2O/MeCN$  : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Spectre de R M N <sup>1</sup>H (500 MHz,  $(CD_3)_2SO$  d<sub>6</sub>,  $\delta$  en ppm) : 0,88 (t, J = 7 Hz, 6H :

- 25  $CH_3$  des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,35 (mt, 60H :  $(CH_2)_{15}$  centraux des chaînes grasses) ; 1,46 et 1,54 (2 mts, 2H chacun : 1  $CH_2$  de chaque chaîne grasse) ; de 1,80 à 2,00 (mt, 6H :  $CH_2$  central des propyles et  $CH_2$  de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 10H :  $NCH_2$  des propyles et  $NCH_2$  de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 3,15 à 3,45 (mt : les 6H correspondant au  $=NCH_2$  de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine et aux  $NCH_2$  des chaînes grasses) ; 3,81 (mf, 2H :
- 30



NCH<sub>2</sub>CON) ; 4,04 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH<sub>2</sub>CON du glycyle) ; 7,88 - 8,61 - 8,74 et 8,99 (4 mfs, 8H en totalité : les échangeables et OH des CF<sub>3</sub>COOH).

MH<sup>+</sup> : 832

## B\ UTILISATION DES AGENTS DE TRANSFECTION SELON L'INVENTION

### 5 Exemple 7 : préparation de complexes nucléolipidiques

Cet exemple illustre la préparation de complexes nucléolipidiques selon l'invention.

Le composé utilisé dans cet exemple est le composé (1) en solution dans du chloroforme. Des quantités de 10 nmoles de composé (1) (soit 11,8 µg) par µg d'ADN  
10 ont été utilisées. Dans certains cas, un co-lipide neutre, Cholestérol ou DOPE, est préalablement mélangé au composé. Un film lipidique fin se forme lorsqu'on évapore le chloroforme à l'aide d'un flux léger d'argon, puis il est réhydraté dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM, pendant toute une nuit, à 4°C. Les échantillons sont ensuite traités aux ultrasons pendant 5 minutes, chauffés à 65°C  
15 pendant 30 minutes, et enfin traités à nouveau aux ultrasons pendant 5 minutes. On obtient ainsi des suspensions lipidiques qui sont stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'ADN utilisé est le plasmide pXL2774 (figure 2) en solution dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM à une concentration de 0,5 mg/ml ou 1,0 mg/ml. Le plasmide pXL2774 possède les caractéristiques suivantes :

- 20 - niveau d'endotoxines inférieur à 50 EU/mg,
- Taux d'ADN superenroulé supérieur à 60%,
- contenu d'ARN, c'est-à-dire d'ARNm, d'ARNt et d'ARN ribosomique, (déterminé par HPLC) inférieur à 5%,
- taux d'ADN chromosomal inférieur à 1%,
- 25 - contenu protéique inférieur à 1%,
- osmolarité inférieure à 15 mosmoles/kg.

On prépare les complexes nucléolipidiques selon l'invention en mélangeant rapidement des volumes égaux de solution d'ADN et de suspension lipidique telles que

décrites ci-dessus. La quantité de composé complexé à l'ADN varie de 0,5 nmoles/ $\mu$ g d'ADN à 12 nmoles/ $\mu$ g d'ADN.

**Exemple 8 : comportement des complexes formés à différent rapport de charge**

Cet exemple illustre le comportement des complexes nucléolipidiques selon l'invention à différents rapport de charge . L'impact de l'ajout d'un co-lipide neutre est également illustré.

La taille des complexes a tout d'abord été analysée en mesurant le diamètre hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Laser Light Scattering) à l'aide d'un appareil Coulter N4plus. les échantillons sont dilués 20 fois dans une solution contenant 5% de dextrose et 20 mM de chlorure de sodium pour éviter les diffusions multiples. L'effet du groupement cycloamidine, de la composition lipidique, et du rapport de charge sur la taille des complexes nucléolipidiques selon l'invention a ainsi été étudié.

On distingue trois phases possibles lorsqu'on augmente le rapport de charge entre le composé (1) selon l'invention et l'ADN. Ces trois phases déterminent le potentiel thérapeutique du composé (1). La figure 3 illustre ces 3 phases pour le composé (1). On peut observer le même comportement pour d'autres composés selon l'invention.

A faible rapport de charge, l'ADN n'est pas saturé par le composé (1). Il reste encore de l'ADN nu, et les complexes sont globalement chargés négativement. Les particules sont de petite taille (entre 100 et 300 nm). Cette phase est appelée « Phase A ».

Le fait que l'ADN ne soit pas complètement saturé par le composé (1) signifie que l'ADN n'est pas complètement protégé par lui. L'ADN peut donc être soumis aux dégradations par les enzymes (DNAases). Par ailleurs, les complexes étant globalement négatifs, le passage de la membrane cellulaires est difficile. Pour ces raisons, les complexes nucléolipidiques de la phase A sont d'une efficacité beaucoup moins grande en transfection.

A rapport de charge intermédiaire, l'ADN est complètement saturé par le composé (1), et les complexes sont globalement neutres ou légèrement positifs. Cette phase est instable car les répulsions ioniques sont minimales et un phénomène de « crosslinking » peut se produire. La taille des particules est bien au dessus de la limite  
5 de détection par diffusion dynamique de la lumière (très supérieure à 3  $\mu\text{m}$ ). Cette phase instable est appelée « phase B ».

Une telle taille de complexes n'est pas adaptée pour des utilisations en injection. Cependant, cela ne signifie pas pour autant que les complexes soient inactifs dans la phase B, mais ils sont seulement sous une formulation qui n'est pas appropriée pour  
10 leur injection dans un but pharmaceutique.

A rapport de charge relativement élevé, l'ADN est sur-saturé par le composé (1), et les complexes sont globalement positifs. Du fait des fortes répulsions entre les charges positives, cette phase est stable. Elle est désignée sous le nom de « phase C ». Contrairement à la phase A, les complexes nucléolipidiques sont sous une forme telle  
15 que l'ADN est très bien protégé vis-à-vis des enzymes, et leur charge globalement positive facilite le passage de la membrane cellulaire de nature anionique. Les complexes de la phase C sont donc particulièrement adaptés à une utilisation pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

En plus du groupement cycloamidine du composé selon l'invention, l'utilisation  
20 d'un co-lipide neutre a un fort impact sur la stabilité des complexes, comme cela est illustré figure 3. Les co-lipides ajoutés sont soit du DOPE (lipide cationique/DOPE = 3/2), soit du cholestérol (lipide cationique /cholestérol = 3/1). En général, l'ajout du co-lipide neutre augmente l'instabilité des complexes, ce qui entraîne l'augmentation de la quantité de composé requise pour atteindre la phase C. Ceci est très clairement  
25 illustré à la figure 3 lorsqu'on compare le rapport de charge auquel la phase C est atteinte en présence et en l'absence de co-lipide.

Il faut noter que les valeurs du rapport de charge qui délimitent les trois phases A, B et C dépendent du composé utilisé. Ainsi, ces valeurs peuvent varier très fortement d'un composé à l'autre.

Enfin, l'affinité du composé vis-à-vis de l'ADN en fonction du rapport de charge a été étudiée. Pour cela, la réduction de fluorescence après ajout de 3 µg de bromure d'éthidium (EtBr) a été mesurée. En effet, la substitution du bromure d'éthidium de l'ADN par le composé est une indication de liaison à l'ADN.

- 5 La formulation utilisée est diluée 20 fois jusqu'à une concentration finale de 25 µg d'ADN/ml. La fluorescence relative mesurée pour l'ADN nu est définie comme étant 100%. Le taux de liaison avec le composé (1) est représenté par la réduction de la fluorescence relative de l'échantillon. La figure 3 montre que la fluorescence diminue quand le rapport de charge augmente, ce qui signifie qu'une plus grande quantité de
- 10 composé (1) est disponible pour se lier à l'ADN (plus la fluorescence décroît, plus une grande quantité de composé se lie à l'ADN jusqu'à atteindre la saturation).

De cette façon, il a été ainsi montré que l'affinité du composé (1) selon l'invention pour l'ADN est déterminée par le groupement cycloamidine, mais pas par l'addition d'un co-lipide.

15 **Exemple 9 : transfection *in vitro* avec le composé (1)**

Cet exemple illustre la capacité du composé (1) selon l'invention à transfecter l'ADN dans les cellules *in vitro*, comparativement à l'ADN non-formulé.

- Des microplaques de 24 puits sontensemencées avec 60000 cellules HeLa (ATCC) par puit, et transfectées 24 heures plus tard. Des complexes contenant 1 µg
- 20 d'ADN sont dilués dans 0,5 ml de milieu de culture DMEM (Gibco/BRL) en l'absence de sérum, puis ajoutés dans chaque puit. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu contenant les complexes est ensuite enlevé et remplacé par un mélange de DMEM et de 10% de sérum de veau foetal. Puis, les cellules sont à nouveau mises en culture pendant 24 heures. Enfin, les cellules sont lysées et testées
- 25 en utilisant un kit de test de luciférase (Promega) et un luminomètre Dynex MLX.

Les résultats indiqués à la figure 4 soulignent la différence entre les performances de l'ADN nu par rapport aux complexes composé (1)/ADN de l'invention totalement saturés : aucune activité luciférase n'a pu être détectée (sensibilité de l'appareil inférieure à 1 pg par puit) après transfection *in vitro* d'ADN

nu, alors que l'activité de transfert de gène des complexes selon l'invention varie de 200 pg/puit à 8000 pg/puit.

Cet exemple montre donc clairement l'utilisation avantageuse du composé (1) selon l'invention pour la transfection des cellules *in vitro*.

5 **Exemple 10 : transfection *in vitro* avec les composés (3), (5) et (6)**

Cet exemple illustre la capacité des composés (3), (5) et (6) selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vitro*, comparativement à l'ADN non-formulé.

La transfection est effectuée selon le protocole de l'exemple 9 précédent, dans des cellules HeLa. Les résultats sont illustrés aux figures 5, 6 et 7. On observe ainsi  
10 que ces 3 composés présentent un bon niveau de transfection *in vitro*.

**Exemple 11 : transfection *in vivo* du composé (1)**

Cet exemple illustre la capacité du composé (1) selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vivo*, comparativement à l'ADN non-formulé et au lipide A de formule condensée  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$   
15 décrit dans la demande WO 97/18185 et dont la structure est représentée représenté à la figure 1.

Le transfert de gène *in vivo* a été effectué sur des souris Balb/C par administration intramusculaire et intraveineuse. Les formulations qui ont été comparées sont des formulations d'ADN nu, des formulations contenant le lipide A, ou  
20 des formulations contenant le composé (1) selon l'invention.

Dans le cas des injections intramusculaires, chaque souris a reçu 30 µl de formulation contenant 15 µg d'ADN dans le muscle antérieur du tibia. Les tissus sont récupérés 7 jours après l'injection, ils sont congelés et stockés à -80°C en attendant d'effectuer les tests d'activité luciférase. Les mesures d'activité luciférase se font comme dans  
25 l'exemple 8.

Dans le cas des injections par voie intraveineuse, chaque souris a reçu 200 µl de formulation contenant 50 µg d'ADN. Les tissus sont récupérés dans ce cas 24 heures après l'injection, puis congelés et stockés de la même façon que précédemment.

Les résultats de transfert de gène *in vivo* sont présentés figure 8 et figure 9. Le rapport entre le composé (1) et l'ADN est de 10 nmoles/ $\mu$ g d'ADN. Le rapport entre le lipide A et l'ADN est de 4 nmoles/ $\mu$ g d'ADN.

La figure 8 illustre l'activité *in vivo* dans le muscle du composé (1) selon l'invention comparativement à l'ADN nu et au lipide A. On constate que les niveaux d'activité luciférase sont équivalents entre l'ADN nu et le composé (1), ce dernier présentant en outre une activité très améliorée par rapport au lipide A. Les mécanismes de transfert impliqués semblent différents entre l'ADN nu et l'utilisation du composé (1) selon la présente invention. En effet, les complexes selon l'invention utilisés ne contiennent pas d'ADN libre (phase C) et de plus, leurs résultats *in vitro* sont très supérieurs à ceux de l'ADN nu.

La figure 9 compare les activités du composé (1) selon l'invention, de l'ADN nu et du lipide A, par voie intraveineuse et par voie intramusculaire.

On constate que l'efficacité de transfection est à peu près équivalente par voie intraveineuse pour le lipide A et pour le composé (1). Par contre, par voie intramusculaire, l'efficacité de transfection du composé (1) selon l'invention est très nettement supérieure à celle du lipide A.

Par rapport à l'ADN nu, le composé (1) présente une transfection par voie intraveineuse, en plus de la transfection au moins équivalente par voie intramusculaire.

Il apparaît donc que l'efficacité de transfert de l'acide nucléique *in vivo* avec le composé (1) selon l'invention est globalement supérieure à celle avec le lipide A qui est un lipide cationique connu et celle de l'ADN non-formulé.

Enfin, il apparaît que les complexes selon l'invention possèdent l'avantage, par rapport à la transfection d'ADN nu, de protéger l'ADN des dégradations par les nucléases, contribuant ainsi à une amélioration significative de la stabilité des formulations. Les composés de la présente invention peuvent être également utilisés pour protéger l'ADN des détériorations au cours de la lyophilisation, améliorant là encore la stabilité des formulations.

**Exemple 12 : transfection *in vivo* des composés (5) et (6)**

Cet exemple illustre la capacité des composés (5) et (6) à transfecter de l'acide nucléique *in vivo* de façon efficace.

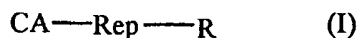
Le même protocole qu'à l'exemple précédent est mis en oeuvre. La figure 10  
5 montre que le composé (5) et le composé (6), formulés dans un rapport de charges 0,25:1 avec l'ADN sans co-lipide, présentent un niveau de transfection *in vivo* supérieur ou égal à l'ADN nu 48 heures après injection en i.m.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus avec les composés (5) et (6) dans différentes formulations :

Composé	Rapport de charges composé/ADN	Co-lipide	RLU/poumon	pg/poumon	voie d'administration
Composé (5)	6/1	DOPE (1:1)	254,9	1611,3	i.v.
Composé (5)	8/1	DOPE (1:1)	535,2	3558,1	i.v.
Composé (5)	0,5/1	Chol. (3:1)	209,6	1330,5	i.m.
Composé (5)	0,5/1	DOPE (1:1)	155,8	974,6	i.m.
Composé (6)	6/1	-	175,1	1098,7	i.v.
Composé (6)	5/1	DOPE (1:1)	407,7	2700,8	i.v.
Composé (6)	0,5/1	DOPE (1:1)	1768,7	13005,4	i.m.

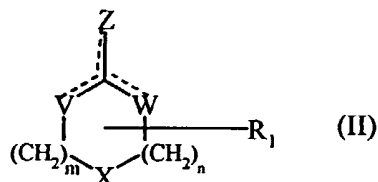
REVENDICATIONS

1. Composés, sous forme D, L ou DL, ainsi que ses sels, de formule générale (I) :



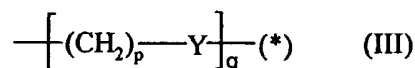
pour laquelle :

- 5      ① CA représente un groupement cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



pour laquelle :

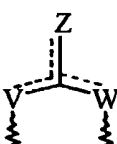
- m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels
- 10      que  $m+n$  est supérieur ou égal à 1,
- $R_1$  représente un groupement de formule générale (III) :



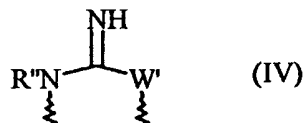
- pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, Y représente un groupement carbonyle, amino, méthylamino, ou bien
- 15      méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements  $[(\text{CH}_2)_p - \text{Y}]$ , et (\*) représente soit un atome d'hydrogène, soit est le lieu de liaison au groupement Rep,
- étant entendu que  $R_1$  peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II), y compris Z, et qu'il y a un unique groupe  $R_1$  dans la formule (II),

- 20      • X représente un groupement  $\text{NR}_2$  ou bien  $\text{CHR}_2$ ,  $R_2$  étant soit un atome d'hydrogène soit la liaison au groupe  $R_1$  tel que défini précédemment,



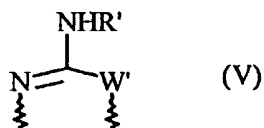
• Le groupement  représente :

\* 1<sup>er</sup> cas : un groupement de formule générale (IV) :



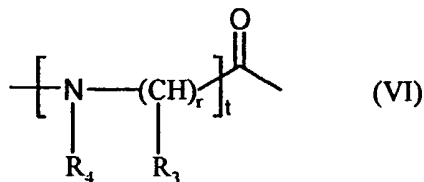
pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent  
5 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au  
groupe R<sub>1</sub> tel que défini précédemment, ou bien

\* 2<sup>ème</sup> cas : un groupement de formule générale (V) :



pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R' et R''' représentent  
10 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au  
groupe R<sub>1</sub> tel que défini précédemment,

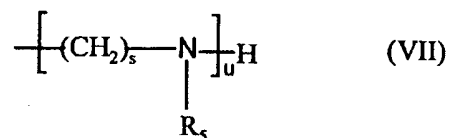
② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



dont l'atome d'azote est rattaché aux atomes X, V, W, ou Z ou au substituant Y du  
15 groupe R<sub>1</sub> selon les cas, et

- t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,
- r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements -NR<sub>4</sub>-(CH)<sub>r</sub>-,

•  $R_3$ , qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements  $NR_4-(CH)_rR_3$ , représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :



- 5 pour laquelle  $u$  est un entier compris entre 1 et 10 inclus,  $s$  est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements  $-(CH_2)_s-NR_5$ , et  $R_5$  est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale
- 10 (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

•  $R_4$  est défini de la même façon que  $R_3$  ou bien représente un groupement CA tel que défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

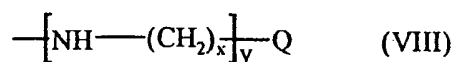
- 15        ③  $R$  est lié à la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent  $R$  est lié directement au groupement CA, et représente :

\* soit un groupement de formule  $NR_6R_7$  pour laquelle  $R_6$  et  $R_7$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de

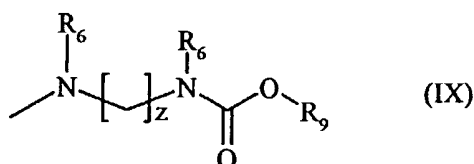
20 carbone, avec l'un au moins des deux substituants  $R_6$  ou  $R_7$  différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

\* soit un dérivé de stéroïde,

\* soit un groupement de formule générale (VIII) :



pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement  $C(O)NR_6R_7$  pour lequel  $R_6$  et  $R_7$  sont définis comme précédemment, soit Q représente un groupement  $C(O)R_8$  pour lequel  $R_8$  représente un groupement de formule (IX) :



5

pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et  $R_9$  est un radical aliphatique saturé ou non, éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde, et les deux substituants  $R_6$  sont, indépendamment l'un de l'autre, définis comme précédemment,

10 ou bien  $R_8$  représente un groupement  $-O-R_9$  pour lequel  $R_9$  est défini comme ci-dessus.

2. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que le groupement  $R_1$  est lié soit à Z soit à V d'une part et au groupement Rep d'autre part par l'intermédiaire de Y.

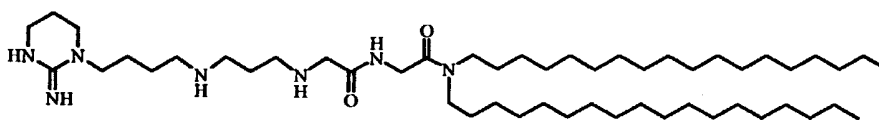
3. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que la tête cycloamidine CA  
15 de formule (II) comporte 5, 6, 7, ou 8 chaînons.

4. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que  $R_3$  représente un atome d'hydrogène ou un méthyle et  $R_4$  est tel que défini dans la revendication 1, ou bien  $R_3$  et  $R_4$  présent dans la formule (VI) représentent des atomes d'hydrogène, ou bien  $R_4$  est un atome d'hydrogène et  $R_3$  est un groupement de formule (VII) dans laquelle  $R_5$   
20 représente un groupement CA

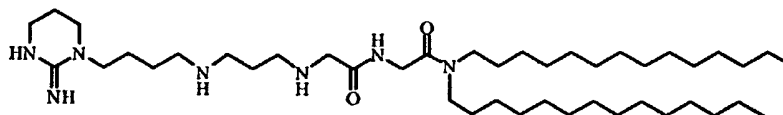
5. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que, dans la formule (V), p et q sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3 ou 4.

6. Composés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les groupements  $R_6$  et  $R_7$  sont identiques ou différents et représentent chacun des chaînes aliphatiques saturées  
25 ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, contenant 10 à 22 atomes de carbone.

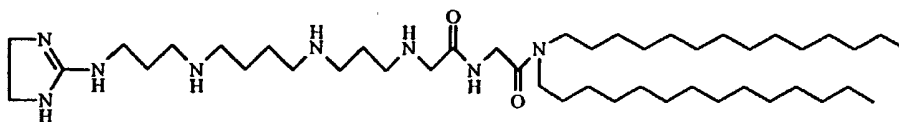
7. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que les groupements  $R_6$  et  $R_7$  sont identiques ou différents et représentent chacun des chaînes aliphatiques saturées ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, et contenant 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone.
- 5 8. Composés selon la revendications 1 caractérisés en ce que lorsque R est un dérivé de stéroïde, ledit dérivé de stéroïde est choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- $\alpha$ -5-cyclo-5- $\alpha$ -cholestan-6- $\beta$ -ol, l'acide cholique, le cholestérylformiate, le cholestanylformiate, le 3 $\alpha$ ,5-cyclo-5 $\alpha$ -cholestan-6 $\beta$ -yl formiate, la cholestérylamine, la
- 10 [2,3]cyclopenta-[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.
9. Composés selon la revendication 1 de formules :



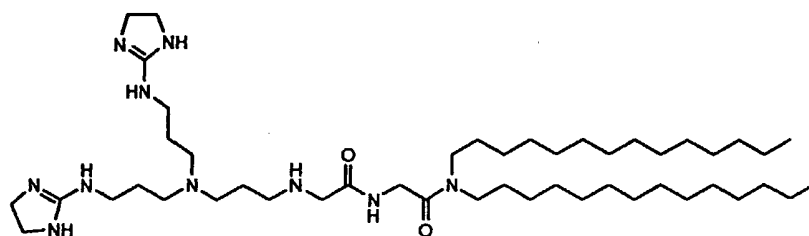
Composé (1)



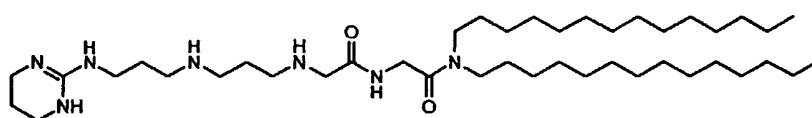
composé (2)



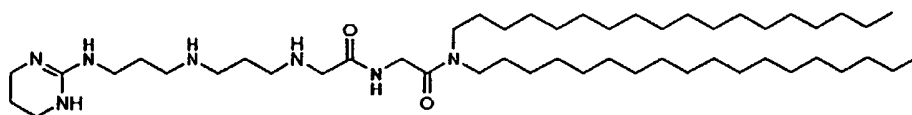
Composé (3)



Composé (4)



Composé (5)



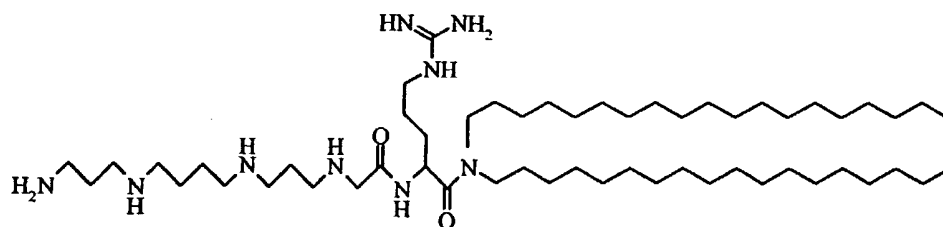
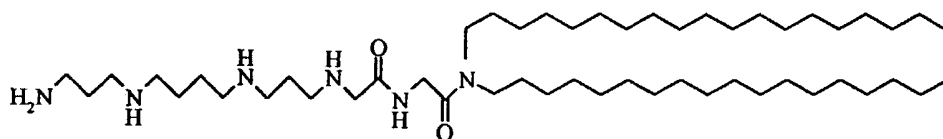
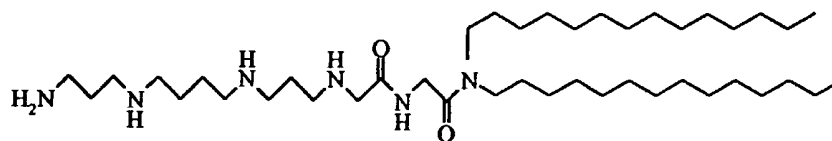
Composé (6)

10. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 9 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des briques portant la/les fonctions cycloamidine puis l'on greffe ces briques sur des lipides équipés de répartiteurs.
11. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des lipopolyamines analogues puis l'on effectue la cyclisation en groupements cycloamidine.
12. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule générale (I).
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comprend un composé de formule générale (I) et un acide nucléique.
14. Composition selon les revendications 12 ou 13 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs adjuvants.

15. Composition selon la revendications 14 caractérisée en ce que le ou les adjuvants sont un ou plusieurs lipides neutres à deux chaînes grasses.
16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge  
5 ionique dans les conditions physiologique, choisis par exemple parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galacto-  
10 cérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
17. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.
- 15 18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que ledit adjuvant dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés, ou bien est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.
- 20 19. Composition selon les revendications 12 à 18 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs agents de surface non-ionique(s) en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques.
20. Composition selon les revendications 12 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
- 25 21. Composition selon les revendications 12 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

22. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un acide désoxyribonucléique ou un acide ribonucléique.
23. Composition selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.
24. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 9 pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies.
25. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 9 pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies par transfert d'acides nucléiques dans les cellules par voie intramusculaire.
26. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :
- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé de formule générale (I) tel que défini ci-avant, pour former un complexe nucléolipidique, et
- (2) la mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique formé en (1).
27. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 26 caractérisée en ce que ledit acide nucléique et/ou ledit composé sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvants.
28. Méthode de traitement de maladies par administration d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger lesdites maladies, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I).

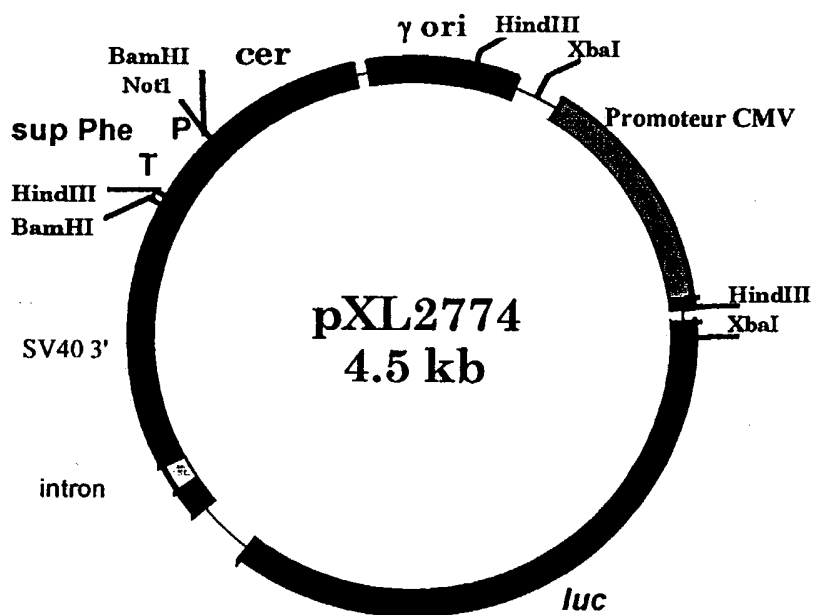
1/10

FIG. 1/10**lipide A****lipide B****lipide C**



2/10

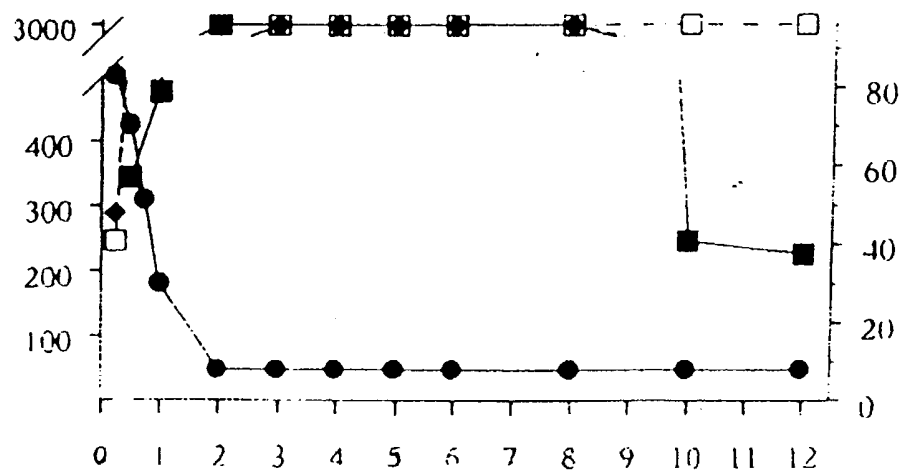
FIG. 2/10



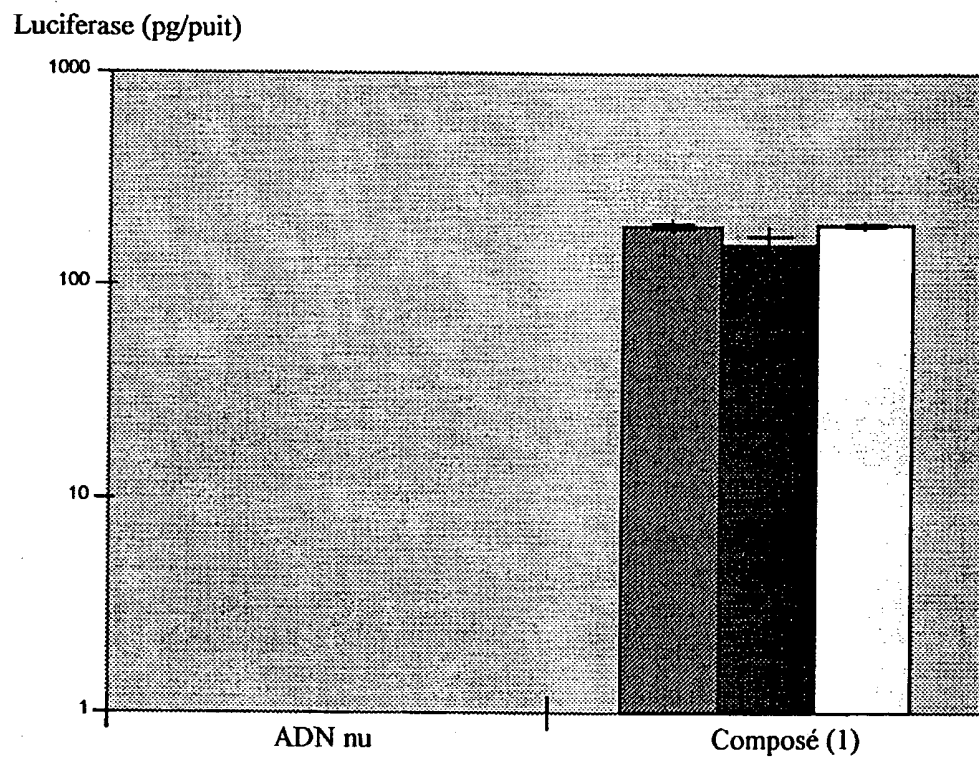
3/10

FIG. 3/10

Composé 1

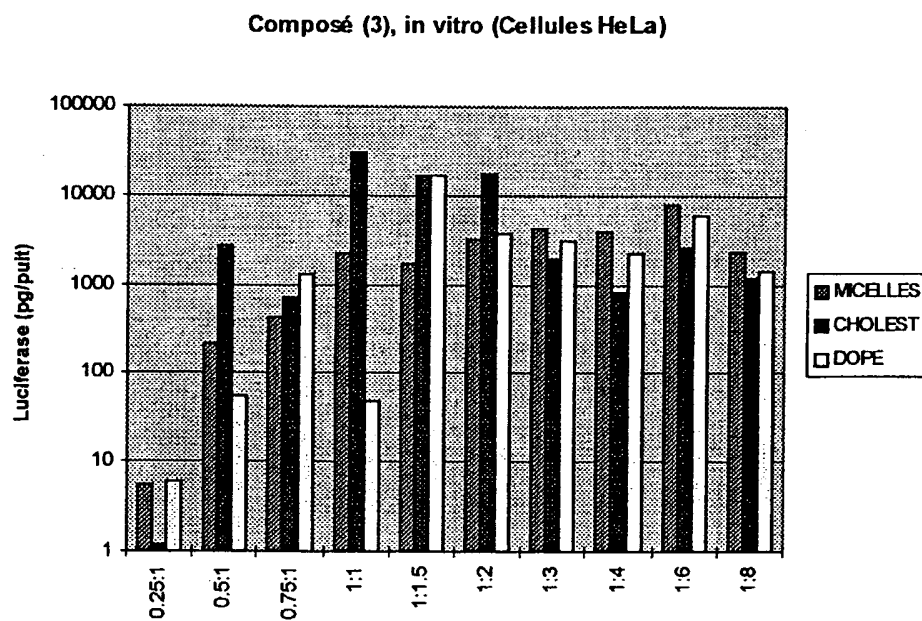


4/10

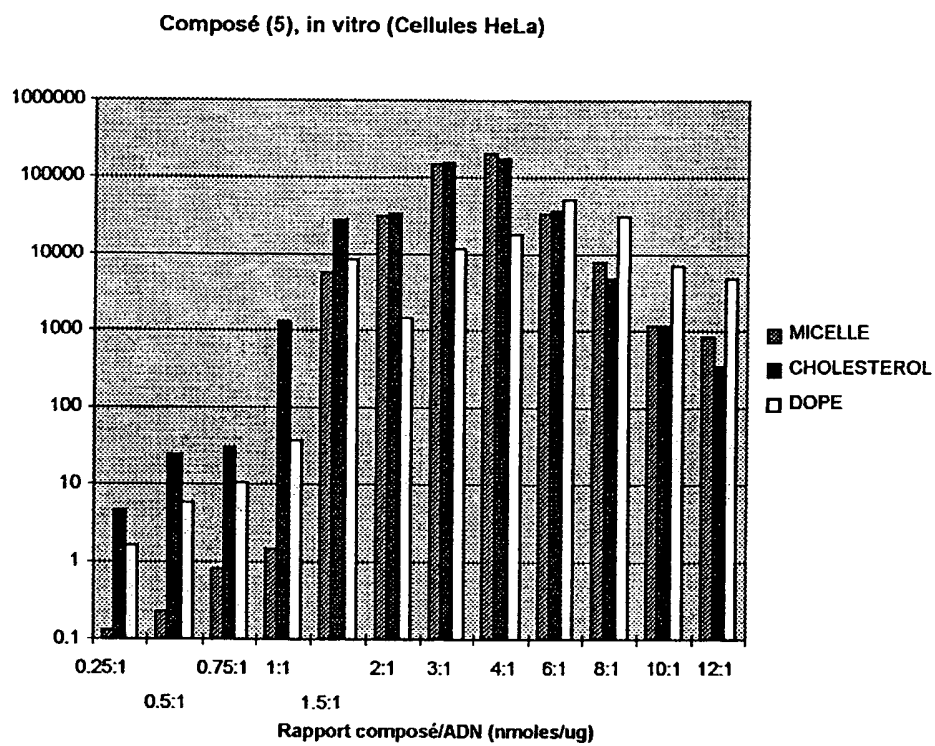
FIG. 4/10

5/10

FIG. 5/10



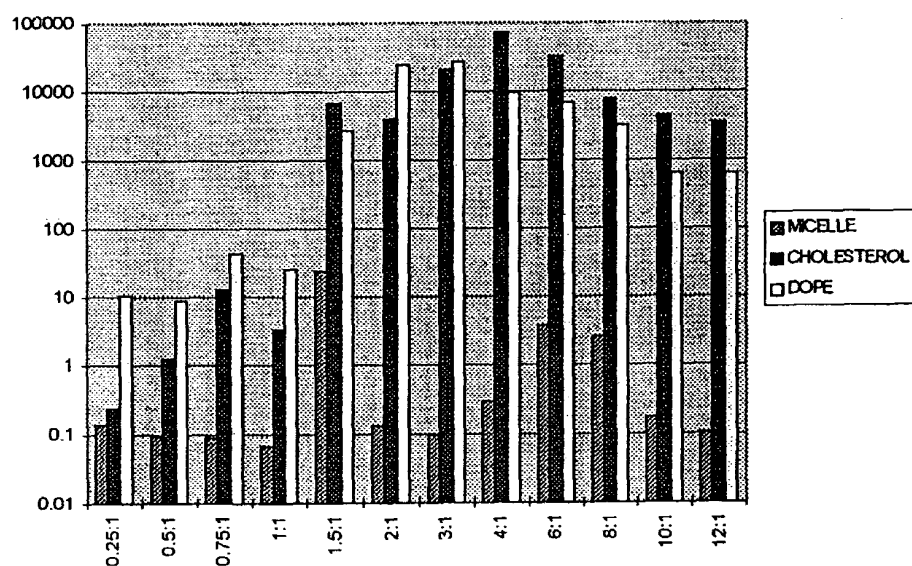
6/10

FIG. 6/10

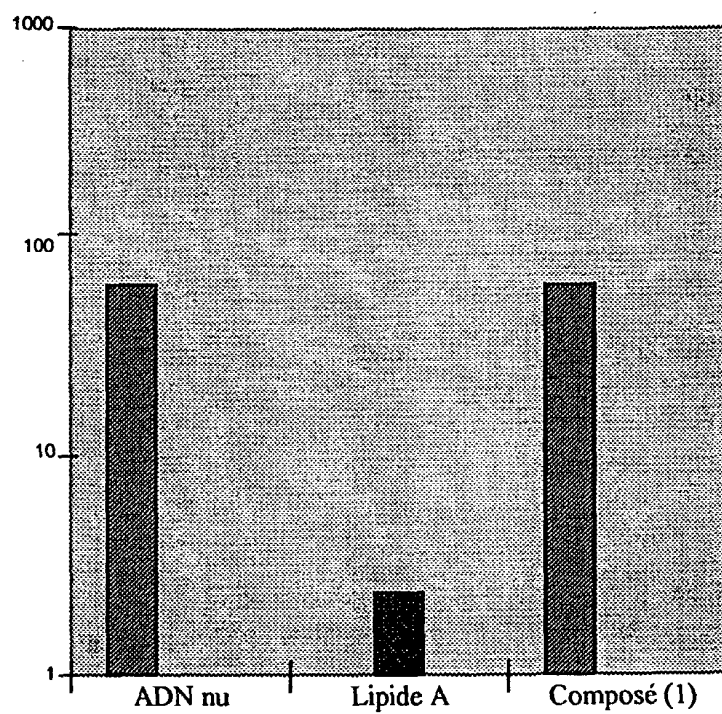
7/10

FIG. 7/10

Composé (6), in vitro (cellules heLa)



8/10

FIG. 8/10

9/10

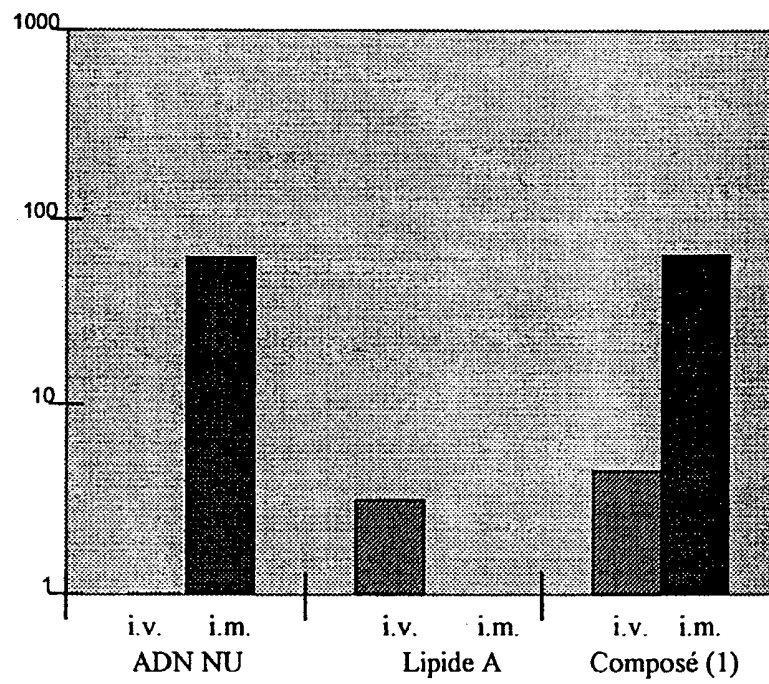
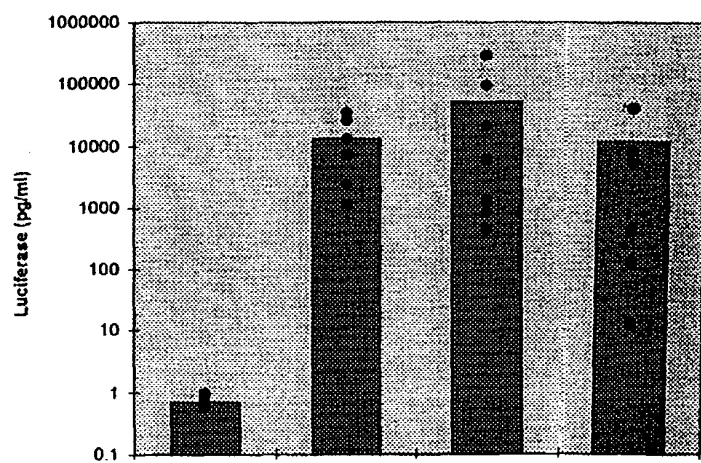
FIG. 9/10



FIG. 10/10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00740

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D233/48 C07D239/14 C12N15/87 A61K31/47 C07J41/00  
C07K5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D C12N A61K C07K C07J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 May 1997 cited in the application see claims ---	1-28
Y	WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 September 1997 see claims ---	1-28
A	WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 June 1996 see claims ---	1-28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 July 1995 see claims ---	1-28
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1999

Date of mailing of the international search report

31/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00740

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 October 1990 cited in the application see the whole document ---	1-28
A	WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 March 1993 see claims -----	1-28